

Aus dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
im Forschungsverbund Berlin e.V.
(Direktor: Prof. Dr. H. Hofer)
eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung zur Bovinen Virusdiarrhoe / Mucosal Disease (BVD/MD)
bei Kleinkantschilen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Antje Semrau
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3428

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Hofer
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K. Eulenberger
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. K. E. Müller

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Bovine viral diarrhoea virus 1, Pestivirus, viral diseases, Tragulidae, ruminants,
Artiodactyla, experimental infections

Tag der Promotion: 14. Januar 2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-887-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Literaturübersicht | 3 |
| 2.1 | Kleinkantschile (<i>Tragulus javanicus/kanchil</i>) | 3 |
| 2.1.1 | Systematik und Phylogenie | 3 |
| 2.1.2 | Morphologie und Physiologie | 4 |
| 2.1.3 | Geographische Verbreitung, Habitat und Verhalten | 6 |
| 2.1.4 | Bedeutung für den Menschen | 7 |
| 2.1.5 | Schutzstatus | 7 |
| 2.2 | Das Bovine Virusdiarrhoe Virus | 7 |
| 2.2.1 | Taxonomie: Genotypen, Spezies und Biotypen | 7 |
| 2.2.2 | Morphologie | 8 |
| 2.2.3 | Genom, Proteine und Replikation | 9 |
| 2.2.4 | Folgen der Virusinfektion auf zellulärer Ebene | 12 |
| 2.2.5 | Tenazität | 13 |
| 2.3 | Die Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease | 13 |
| 2.3.1 | Epidemiologie | 14 |
| 2.3.2 | Verlaufsformen bei postnataler Erstinfektion | 15 |
| 2.3.3 | Verlaufsformen bei pränataler Erstinfektion | 16 |
| 2.3.4 | Persistierende Infektionen | 18 |
| | Etablierung und Erhalt | 18 |
| | Klinik und Pathologie | 19 |
| | Die epidemiologische Rolle persistent infizierter Tiere | 21 |
| 2.3.5 | Mucosal Disease | 22 |
| | Experimentelle Induktionen und molekulare Pathogenese | 22 |
| | Klinik | 24 |
| | Pathologie | 25 |
| 2.3.6 | Diagnostik der BVD/MD | 27 |
| 2.3.7 | Kontrolle und Bekämpfung der BVD/MD | 27 |
| 2.3.8 | BVDV bei Schaf, Ziege und Schwein | 28 |
| 2.4 | BVDV-Infektionen bei Wildwiederkäuern | 29 |
| 2.4.1 | Serologische Untersuchungen | 29 |
| 2.4.2 | Klinische Hinweise auf „Mucosal Disease“ | 29 |
| 2.4.3 | Nachweis von BVD-Virus | 30 |
| 2.4.4 | Persistierende Infektionen bei Wildwiederkäuern | 35 |
| 2.4.4.1 | Persistierende Infektion bei Elenantilopen | 35 |
| 2.4.4.2 | Persistierende Infektionen bei Kleinkantschilen | 36 |
| 2.4.4.3 | Persistierende Infektionen bei Schneegämsen | 38 |
| 2.4.4.4 | Persistierende Infektionen bei Alpakas | 38 |
| 2.4.5 | Experimentelle Infektionen von Wildwiederkäuern mit BVDV | 40 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------|---|----|
| 3. | Material und Methoden | 42 |
| 3.1 | Das Versuchstier | 42 |
| 3.2 | Die beteiligten Viren | 42 |
| | Das persistierende nzp BVDV PvMd | 42 |
| | Das zp BVDV SH9/11 | 43 |
| 3.3 | Rechtliche Grundlagen zum Versuch | 43 |
| 3.4 | Haltung und Fütterung | 44 |
| 3.5 | Beobachtungszeitraum | 44 |
| 3.6 | Experimentelle Infektion | 44 |
| 3.7 | Klinische Untersuchung und Probengewinnung | 44 |
| 3.8 | Bestimmung von Gesamtleukozytenzahl und Differenzialblutbild | 48 |
| 3.9 | Zellkulturen | 48 |
| 3.10 | Virusvermehrung und -titration | 48 |
| 3.11 | Kulturelle Virusisolierung | 49 |
| 3.12 | Virusneutralisationstest | 50 |
| 3.13 | Isolierung und Aufarbeitung der Leukozytenfraktion | 51 |
| 3.14 | Nachweis von BVDV im Probenmaterial mittels RT-PCR | 51 |
| | RNA-Isolierung | 51 |
| | Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) | 52 |
| | Gelelektrophorese | 54 |
| 3.15 | Sequenzierung ausgewählter PCR-Amplifikate | 55 |
| | Reinigung von PCR-Amplifikaten | 55 |
| | Durchführung der Sequenzierungsreaktion | 55 |
| 3.16 | Histologische Untersuchung | 56 |
| | Herstellung von Paraffinschnitten | 56 |
| | Färbung | 56 |
| 3.17 | Immunhistochemischer Nachweis von BVDV-Antigen | 56 |
| | Erstellung der Präparate | 57 |
| | Immunhistochemischer Nachweis | 58 |
| 4. | Ergebnisse | 60 |
| 4.1 | Ergebnisse der Untersuchungen <i>intra vitam</i> | 60 |
| 4.1.1 | Klinischer Verlauf | 60 |
| 4.1.2 | Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung | 62 |
| 4.1.3 | Ergebnisse der Virusneutralisationstests | 64 |
| 4.1.4 | Ergebnisse der kulturellen Virusisolierung und -vermehrung von Nasensekret- und Speichelproben | 64 |
| 4.1.5 | Erfolgskontrolle zur Spezifität der eingesetzten Primer und Nachweis der beteiligten BVDV-Stämme in Leukozyten, Nasensekret, Speichel, Kot und Ejakulat | 64 |
| 4.1.6 | Zusammenfassung der Ergebnisse <i>ante mortem</i> | 67 |
| 4.2 | Ergebnisse der Untersuchungen <i>post mortem</i> | 68 |
| 4.2.1 | Ergebnisse der pathologischen Untersuchung | 68 |
| | Makroskopische Befunde | 68 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|--------|--|-----|
| | Mikroskopische Befunde | 69 |
| | Zusammenfassung | 72 |
| 4.2.2 | Ergebnisse der kulturellen Virusisolierung und -vermehrung von Organproben | 72 |
| 4.2.3 | Nachweis der beteiligten BVDV-Stämme in Organen und Geweben | 72 |
| 4.2.4 | Darstellung von BVDV-Antigen in Organen und Geweben | 74 |
| 4.2.5 | Tabellarische Übersicht über die Ergebnisse der virologischen und immunhistochemischen Untersuchungen <i>post mortem</i> | 78 |
| 5. | Diskussion | 81 |
| 5.1 | Diskussion des Experiments | 81 |
| 5.1.1 | Erörterung der Methodik | 81 |
| | Die Versuchseinheit | 81 |
| | Die Wahl des zp BVDV | 81 |
| | Praktische Aspekte der experimentellen Superinfektion | 81 |
| | Der Beobachtungszeitraum | 82 |
| | Fang- und Narkosetechnik | 83 |
| | Einfluss von Narkose und Stress auf weißes Blutbild und Rektaltemperatur | 83 |
| | Virusneutralisationstest | 84 |
| | Nachweis von BVDV-RNA in Ausscheidungen, Organen und Geweben | 84 |
| | Nachweis von BVDV-Antigen in Organen und Geweben | 85 |
| 5.1.2 | Erörterung der Ergebnisse | 85 |
| | Klinik, Körpermasse, Rektaltemperatur und weißes Blutbild | 85 |
| | Serokonversion | 89 |
| | Ausscheidung von nzp und zp BVDV | 90 |
| | Erörterung der Sektionsbefunde | 92 |
| | Verteilung von nzp und zp BVDV in Organen und Geweben | 93 |
| 5.1.3. | Bestätigung der persistierenden Infektion | 94 |
| 5.1.4 | Hypothese zum Verlauf nach experimenteller Superinfektion | 94 |
| 5.1.5 | Mögliche Gründe für das Ausbleiben klinischer und pathomorphologischer Symptome einer MD | 97 |
| | Praktische Gründe | 97 |
| | Gründe auf Seite des inokulierten zp BVDV | 97 |
| | Gründe auf Seite des PI Individuums | 99 |
| 5.2 | Das BVDV in der Population von Kleinkantschilen | 102 |
| | Rückblick | 102 |
| | Zeitpunkt und Quelle der BVDV-Infektion | 103 |
| | Mögliche Einflüsse der BVDV-Infektion | 104 |
| | Das persistierende BVDV und die Empfänglichkeit der Spezies | 107 |
| 5.3 | Konsequenzen | 108 |
| | Das Risiko der Ausbildung homo- oder heteronomer Infektketten | 108 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----|---|-----|
| | Überwachung des BVDV-Status bei Kleinkantschilen | 109 |
| 5.4 | Die Untersuchung zur BVD/MD bei Kleinkantschilen | 110 |
| 6. | Zusammenfassung | 112 |
| 7. | Summary | 114 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 116 |
| 9. | Anhang | 145 |
| 9.1 | Protokolle zu verwendeten Lösungen | 145 |
| 9.2 | Diät | 146 |
| 9.3 | Untersuchungsprotokolle | 147 |
| 9.4 | Tabellarische Probenübersicht | 149 |
| 9.5 | Kenngößen zu Lage und Streuung der klinischen Parameter Körpermasse und Rektaltemperatur sowie zum weißen Blutbild | 150 |
| | Publikationsverzeichnis | 152 |
| | Danksagung | 153 |
| | Selbständigkeitserklärung | 154 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| AEC | 3-Amino-9-ethylcarbazol |
| <i>a.i.</i> | <i>ante infectionem</i> |
| Ak | Antikörper |
| BALT | bronchus-associated lymphatic tissue |
| BEL- | Bovine embryonale Lungen- |
| BFL- | Bovine fetale Lungen- |
| bp | Basenpaar |
| BVD | Bovine Virus Diarrhoe |
| BVDV | Bovines Virus Diarrhoe Virus |
| CSF | Classical Swine Fever |
| CSFV | Classical Swine Fever Virus |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| dsRNA | doppelsträngige Ribonukleinsäure |
| EBTr | embryonic bovine trachea |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| FKS | fetales Kälberserum |
| GALT | gut-associated lymphoid tissue |
| Gl. | Glandula |
| <i>i.c.</i> | intracardial |
| IFN | Interferon |
| Jiv | J-domain protein interacting with viral protein |
| KFZ | kapilläre Füllungszeit |
| KID | kulturinfektiöse Dosis |
| Lc. | Lymphocentrum |
| Ln. | Lymphonodus |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MDBK- | Madin Darby Bovine Kidney |
| M-MLV | Moloney Mouse Leukaemia Virus |
| NALT | nose-associated lymphatic tissue |
| nzp | nicht-zytopathogen |
| ORF | <i>open reading frame</i> |
| PBS | phosphatgepufferter Natriumchloridlösung |
| PI | persistent infiziert |
| <i>p.c.</i> | <i>post conceptionem</i> |
| <i>p.i.</i> | <i>post infectionem</i> |
| PvMd | Pestivirus mousedeer |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| s | Standardabweichung |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------|---|
| SDS | Sodium-Dodecyl-Sulfat |
| SK | swine kidney |
| SPARKS | Single Population Animal Record Keeping System |
| UTR | untranslated region |
| VNT | Virusneutralisationstest |
| WBC | white blood cell count |
| \bar{x} | arithmetisches Mittel |
| x_{\max} | Maximalwert |
| x_{\min} | Minimalwert |
| Zb.Nr. | Zuchtbuchnummer |
| ZNS | Zentralnervensystem |
| zp | zytopathogen |
| zpE | zytopathogener Effekt |

1. Einleitung

Die Bovine Virusdiarrhoe (BVD) ist eine meist enzootisch verlaufende Infektionskrankheit des Rindes, die sich in unterschiedlichen Formen manifestieren kann. Je nach Disposition des betroffenen Tieres, der Immunitätslage in der Herde, dem Geno- und Biotyp sowie der Virulenz des Erregers, dem Bovinen Virusdiarrhoe Virus (BVDV), kann eine Infektion subklinisch verlaufen, milde Erkrankung des Verdauungs- und Respirationstraktes oder akute Krankheitsverläufe mit Todesfolge hervorrufen. Durch die vorübergehende Immunsuppression stellt eine BVDV-Infektion darüber hinaus einen prädisponierenden Faktor für Ko- und Sekundärinfektionen dar. Im Mittelpunkt des epidemiologischen und pathogenetischen Geschehens steht die Infektion empfänglicher, gravider Rinder, die je nach Trächtigkeitsstadium und Biotyp des Erregers zu Fruchtbarkeitsstörungen, Aborten, dem gehäuften Auftreten lebensschwacher oder missgebildeter Kälber oder der Geburt persistent infizierter Tiere führt. Persistent infizierte Individuen sind durch die großen Virusmengen, die sie lebenslang mit den Körpersekreten und -exkreten ausscheiden von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung von BVDV-Infektionen. Nachkommen weiblicher, persistent infizierter Tiere sind stets ebenfalls persistent infiziert - es entstehen sogenannte „virämische Linien“. Die Strategie des BVDV, durch Kombination transienter und persistierender Infektionen in einer Population präsent zu bleiben, ist unter Viren selten. Einzigartig bei der persistierenden Infektion durch das BVDV ist die hochspezifische Immuntoleranz des Wirtes gegenüber dem infizierenden Virusstamm. Eine persistierende Infektion ist darüber hinaus Voraussetzung für das Auftreten der fatalen Mucosal Disease (MD). Diese sporadische Verlaufsform einer BVDV-Infektion tritt ausschließlich bei mit nicht-zytopathogenem BVDV persistent infizierten Tieren nach Konfrontation mit dem zytopathogenen Biotyp des BVDV auf. Dabei kann es sich um eine endogene Mutation des nicht-zytopathogenen zum zytopathogenen Biotyp oder um eine exogene Superinfektion mit einem zytopathogenen Biotyp des BVDV handeln.

Vor allem vor der ökonomischen Bedeutung, die eine BVDV-Infektion für die Rinderzucht hat, wurden seit den 1960er Jahren vielerorts Untersuchungen zum Vorkommen von BVDV-Infektionen bei Wildwiederkäuern durchgeführt. Ziel der Studien waren Erkenntnisgewinne im Hinblick auf die Empfänglichkeit verschiedener Spezies für BVDV, die Pathogenität des BVDV für verschiedene Arten, eine mögliche Reservoirfunktion von Wildtieren für BVDV und/oder eine wechselseitige Übertragung des Erregers zwischen Haus- und Wildtieren. Serologische Untersuchungen sowohl bei freilebenden als auch in Gefangenschaft gehaltenen Populationen exotischer Paarhufer zeigen, dass Infektionen durch BVDV bei über 50 verschiedenen Arten von Paarhufern der Unterordnungen Ruminantia, Tylopoda und Suina vorkommen können. Isolierung von BVDV gelang unter Paarhufern bisher bei 25 unterschiedlichen Arten. Daneben gibt es etliche Dokumentationen klinischer Fälle bei Wiederkäuern aus zoologischen Gärten, Wildgehegen und freier Wildbahn, in denen BVDV differenzialdiagnostisch eine Rolle spielt. Ob das BVDV in Analogie zum Hausrind auch in exotischen Wiederkäuern imstande ist, eine persistierende Infektion zu etablieren, war lange Zeit unbekannt und wurde erstmalig 1998 durch Anderson und Rowe bei einer frei lebenden Elenantilope (*Taurotragus oryx*) beschrieben. Der erste Nachweis persistierender Infektion

und darüber hinaus vertikaler Transmission des BVDV erfolgte 2002/2003 in einer Population in Gefangenschaft gehaltener Kleinkantschile (*Tragulus spp.*). Seither sind persistierende Infektionen auch bei Alpakas (*Lama pacos*), Schneegämsen (*Oreamnos americanus*), Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) und Wasserbüffeln (*Bubalus bubalis*) nachgewiesen worden.

Noch unbeantwortet ist die Frage, ob, in Analogie zur Pathogenese bei Rindern, ein persistent infizierter Wildwiederkäuer nach Superinfektion mit zytopathogenem BVDV eine MD entwickelt. Es gibt es zwar etliche klinische Beschreibungen, jedoch keine bestätigten Nachweise. Aufgrund der Vielzahl an Differenzialdiagnosen sind die Diagnosen „Bovine Virusdiarrhoe“ oder „Mucosal Disease“ auf der Grundlage allein klinischer und pathologisch-anatomischer oder -histologischer Befunde nicht möglich. Die Diagnose einer über Generationen bestehenden persistierenden Infektion bei in Gefangenschaft gehaltenen Kleinkantschilen bot somit die außerordentliche Gelegenheit, das Auftreten der MD bei exotischen Wiederkäuern anhand der Gattung *Tragulus* als Modell, experimentell zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich inhaltlich in zwei Komplexe: in einem vorrangig behandelten, experimentellen Teil wird untersucht, ob sich in einem persistent infizierten Kleinkantschil MD induzieren lässt. Dabei wird auf folgende Fragestellungen eingegangen:

- wie stellt sich eine mögliche Symptomatik dar?
- wie reagiert das Immunsystem?
- über welche Körpersekrete und -exkrete werden das persistierende sowie das superinfizierende Virus ausgeschieden?
- in welchen Organen und Geweben finden sich das persistierende sowie das superinfizierende Virus?
- lassen sich pathologisch-anatomische und -histologische Veränderungen nachweisen?

In einem zweiten Teil wird das Experiment vor den Hintergrund der in der Kleinkantschilpopulation über Generationen bestehenden, persistierenden Infektion gestellt und die Frage nach der Quelle der BVDV-Infektion und seiner möglichen Auswirkung auf die Populationsentwicklung erörtert. Daten hierzu wurden im Rahmen eines am Artis Royal Zoo, Natura Artis Magistra, Amsterdam, durchgeführten Projektes zur Haltung von Kleinkantschilen in europäischen Zoos zusammengetragen und aufbereitet. Abschließend werden, unter Einbeziehung der Ergebnisse der experimentellen Superinfektion wie der retrospektiven Recherche, Konsequenzen und mögliche Maßnahmen für die Zukunft besprochen.

2. Literaturübersicht

2.1 Kleinkantschile

2.1.1 Systematik und Phylogenie

Kleinkantschile (*Tragulus kanchil* Raffles, 1821) werden innerhalb der Ordnung der Paarhufer (Artiodactyla) in die Unterordnung der Wiederkäuer (Ruminantia) eingeordnet. Sie gehören zur Teilordnung Tragulina (Flower, 1883), welche allein aus der Familie der Tragulidae (Milne-Edwards, 1864), den sogenannten Zwerghirschen, Zwergböckchen oder Hirschferkeln, besteht. Die Familie der Tragulidae umfasst die Gattung *Hyemoschus* mit einer Art, dem Afrikanischen Hirschferkel (*H. aquaticus*), die Gattung *Moschiola* mit einer Art, dem Fleckenkantschil (*M. memmina*) sowie die Gattung *Tragulus* (Brisson, 1762) (Grubb, 2005). Die Artzugehörigkeit innerhalb der Gattung *Tragulus* wurde in den vergangenen zwei Jahrhunderten mehrfach revidiert und vor kurzem auf der Basis kraniometrischer Messungen, Beschreibung von Fellmustern und geographischer Verbreitung neu klassifiziert (Meijaard und Groves, 2004). Während die traditionelle Systematik nur zwei Arten unterschied, das Großkantschil (*T. napu*, Cuvier, 1822) und das Kleinkantschil (*T. javanicus*, Osbeck, 1765) (Grubb, 1993), unterscheidet diese jüngste und umfassendste Studie drei „Art-Gruppen“, eine *T. napu*-, eine *T. javanicus*- sowie die monotypische *T. versicolor*-Gruppe, sechs Arten und bislang 23 Unterarten (Meijaard und Groves, 2004; Grubb, 2005) (Abb. 1).

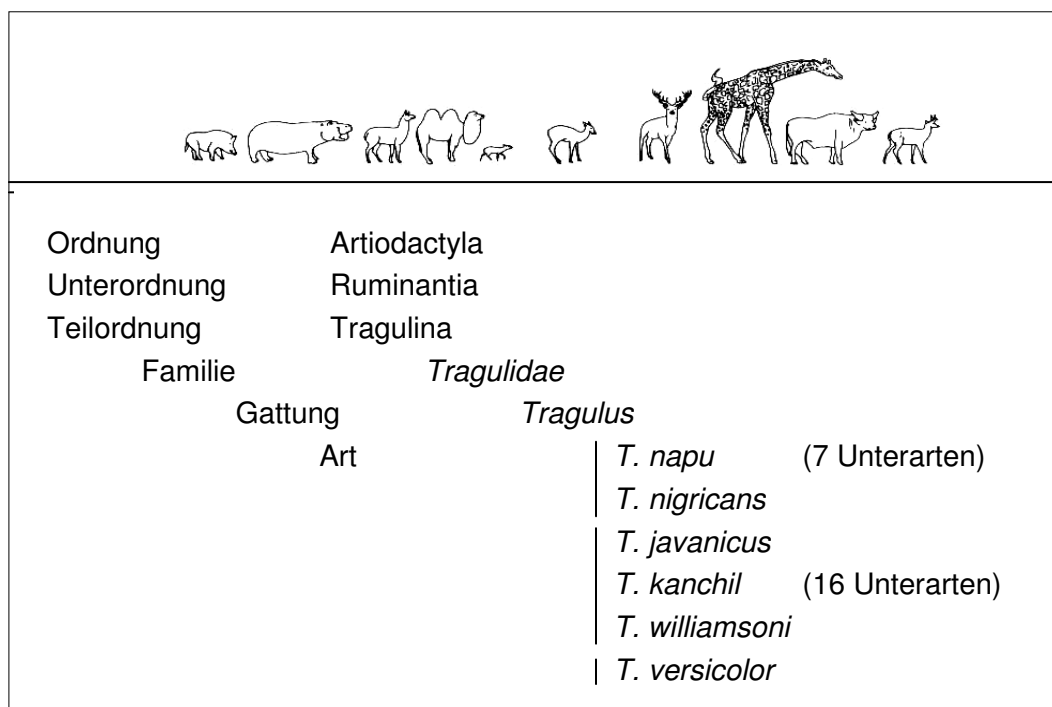


Abb. 1: Systematische Stellung der Kleinkantschile nach Meijaard und Groves (2004) sowie Grubb (2005); Linien symbolisieren die im Text beschriebenen „Art-Gruppen“

Phylogenetisch gelten die rezenten Arten der Familie Tragulidae als ursprünglichste Tiergruppe der Wiederkäuer. Fossile Tragulina sind aus dem mittleren Eozän bis späten Oligozän mit zahlreichen Formen nachgewiesen. Die frühesten gesicherten Funde von Vorfahren der heutigen Traguliden gehen auf das Miozän zurück (z.B. die Gattungen *Dorcatherium*, *Dorcabune* und *Gobiomeryx*) (Janis, 1984; Starck, 1995). Erst vor vergleichsweise kurzer Zeit wurde im südlichen Thailand der aus dem späten Eozän stammende Tragulide *Archaeotragulus krabiensis* entdeckt, der nun als der älteste nachgewiesene Vorfahr der Familie der Tragulidae diskutiert wird (Metais et al., 2001).

2.1.2 Morphologie und Physiologie

Ausgewachsene Kleinkantschile erreichen eine Kopf-Rumpf-Länge von 45-55 cm, eine Schulterhöhe von 20-25 cm und eine Körpermasse von 1,5-2,5 kg (Karasov, 2003). Angaben zu einem Geschlechtsdimorphismus hinsichtlich Größe und Körpermasse variieren (Karasov, 2003; National Research Council, 1991; Barrette, 1987; Ralls, 1976). Kleinkantschile haben einen schmalen Körper mit dorsal konvexer Rückenlinie und überbaut erscheinender Hinterhand, einen kurzen Hals und sehr filigrane Beine (Abb. 2). Das Fell ist kurz und graubraun, kann jedoch je nach geographischer Herkunft verschiedene Farbstiche annehmen. Charakteristisch sind eine weiße Zeichnung an der Halsunterseite sowie eine weiße Brust und Bauchunterseite (Smit-van Dort, 1989; Meijaard und Groves, 2004). Am schmalen, spitz zulaufenden Kopf fallen ausgesprochen große Augen, abgerundete, beinahe haarlose Ohren und die schlitzförmigen, unbehaarten Nasenöffnungen auf. Keines der beiden Geschlechter besitzt einen Stirnaufsatz (Robin, 1988; Nowak, 1999; Karasov, 2003).



Abb. 2: Weiblicher Kleinkantschil im Artis Royal Zoo, Natura Artis Magistra, Amsterdam

Die Körperlast eines Kleinkantschils ruht auf den zum Kanonbein fusionierten Metapodien III und IV. Die Metapodien II und V sind reduziert, liegen jedoch als dünne Stifte seitlich der Extremitätenachse vor. Am Basipodium lassen sich sechs Karpalknochen an der Vorder- und vier Tarsalknochen an der Hintergliedmaße unterscheiden; die *Ossa trapezoideum* (CII) und *capitatum* (CIII), *naviculare*, *cuneiforme intermedium* (TII) und *laterale* (TIII) sowie das *Os cuboideum* (TIV) sind verschmolzen (Smit-van Dort, 1989; Starck, 1995; Hendrichs und Frey, 2003). Eine anatomische Besonderheit der Kleinkantschile findet sich im Bereich der Fascia thoracolumbalis, die bei adulten Männchen sekundär verknöchert und zwischen Becken- und Schulterregion ein lamellenartiges Rückenschild ausbildet (Dubost und Terrade, 1970; Robin, 1979; Starck, 1995; Hendrichs und Frey, 2003). Im Bereich der Becken- und Lumbalregion findet sich bei beiden Geschlechtern das sogenannte Dermalschild, eine drei- bis vierfache Verdickung der Hypodermis, die allen Traguliden zueigen ist (Dubost und Terrade, 1970; Robin, 1979; Wemmer und West, 1982). Weiterhin sei die zwischen den beiden Unterkieferästen liegende und vor allem bei männlichen Individuen markante, komplexe Intermandibulardrüse erwähnt, deren Exkrete eine entscheidende Rolle im Sozial- und Paarungsverhalten der Tiere spielen (Agungpriyono, 2006). Neben dieser Drüse verfügen Kleinkantschile über Hautdrüsenfelder im Bereich des Anus, an der Schwanzunterseite und im Bereich des Präputiums (Robin, 1979; Starck, 1995). Das Gesäuge weiblicher Tiere besteht aus vier inguinal angeordneten Komplexen mit je einer Zitze (Robin, 1979; Starck, 1995; Hendrichs und Frey, 2003).

Die Zahnformel des Dauergebisses der Traguliden lautet $(0\ 1\ 3\ 3 / 3\ 1\ 3\ 3) \times 2 = 34$, wobei die unteren Canini in die Reihe der Incisivi eingegliedert sind. Während die oberen Canini bei männlichen Kleinkantschilen prominent (bis 2 cm Länge) und sichelartig gebogen sind, sie dienen als Imponierorgan und Waffe bei intra- und interspezifischen Auseinandersetzungen, bleiben sie bei weiblichen Tieren kurz, stiftförmig und von außen nicht sichtbar. Prämolare und Molare werden als brachyo- und selenodont charakterisiert (Vidyadaran et al., 1981; Smit-van Dort, 1989; Hendrichs und Frey, 2003). Als charakteristisches Merkmal des Verdauungstraktes eines Kleinkantschils sei das dreikammerige Vormagensystem bemerkt. Ein funktionell ausgebildeter Blättermagen fehlt, er ist nur in Form einer rudimentären, sogenannten „Übergangszone“ zu erkennen (Vidyadaran et al., 1982; Agungpriyono et al., 1992 und 1995b; Hendrichs und Frey, 2003). Hinsichtlich des Ernährungstypus zeigt der Verdauungsapparat eines Kleinkantschils Merkmale eines Konzentratsselektierers (Vidyadaran et al., 1994; Agungpriyono et al., 1992, 1995a und b; Endo et al., 2002; Farida et al., 2006).

Der Sexualzyklus eines Weibchens dauert 14-16, die Östrusphase 1-2 Tage. Nach einer Tragezeit von rund 140 Tagen wird ein Jungtier geboren, Zwillingsgeburten sind selten. Innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt tritt ein postpartaler Östrus auf, der es den Weibchen ermöglicht, während ihres gesamten Erwachsenenendaseins trächtig zu sein (Robin, 1979; Kudo et al., 1997; Kimura et al., 2004). Die Gebärmutter eines Kleinkantschils wird als *uterus bicornis*, der Mutterkuchen als adeziduate *Semiplazenta diffusa incompleta* und als *Plazenta epitheliochorialis* definiert (Starck, 1995; Hendrichs und Frey, 2003; Soma, 2004). Jüngste Untersuchungen von Kimura et al. (2004) regen jedoch an, die Kleinkantschil-Plazenta als eine Übergangsform zwischen diffus epitheliochorial and polycotyledon

synepitheliochorial (syndesmochorial) zu betrachten. Der männliche Reproduktionstrakt zeichnet sich vor allem durch den distal rechts-schraubig gewundenen Penis mit proximalen, lappenartigen Fortsätzen sowie durch das Fehlen eines Urethralfortsatzes aus (Starck, 1995; Vidyadaran et al., 1999, Hendrichs und Frey, 2003).

Zur Lebenserwartung von Kleinkantschilen in freier Wildbahn liegen keine Daten vor, in menschlicher Obhut liegt sie bei 11-16 Jahren (Robin, 1988; Jones, 1993; Karasov, 2003).

2.1.3 Geographische Verbreitung, Habitat und Verhalten

Kleinkantschile bewohnen die Tropen und Subtropen des südöstlichen Asiens. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Indonesien, Malaysia und Singapur über Thailand, Birma, Kambodscha, Laos und Vietnam bis ins südliche China (Grubb, 2005).

Zur Ökologie von Kleinkantschilen liegen vermutlich aufgrund ihrer kryptischen Lebensweise nur wenige Daten vor. Den natürlichen Lebensraum der sesshaften Kleinkantschile bilden mit dichtem Unterholz bestandene tropische Wälder. Man findet sie aber auch in Mangrovendickichten und buschreichem Kulturland, oft in Gewässernähe (Ahmad, 1994; Karasov, 2003; Farida, 2006). Ihre zirkadiane Periodik besteht aus unregelmäßigen Wechsels zwischen Aktivität und Ruhe, mit lokomotorischen Maxima in den frühen Morgen- und Abendstunden (Robin, 1979; Ahmad, 1994; Miura et al., 1997; Matsubayashi et al., 2003 und 2005). Ruhezeiten verbringen sie verborgen im Dickicht des Regenwaldes, in hohlen Baumstämmen oder zwischen Felsspalten, während sie sich zur Futtersuche auf tunnelartigen Pfaden durch das Unterholz bewegen (Ahmad, 1994). Das Nahrungsspektrum umfasst überwiegend jungen Blätter, Triebe, Kräuter und Knospen, in geringerem Umfang auch Früchte (Robin, 1988; Ahmad, 1994; Miura et al., 1997; Farida et al., 2006). In Zoos werden auch kleine Insekten und Würmer aufgenommen, inwiefern diese in der Natur zu ihrer Nahrung gehören, ist unbekannt (Robin, 1988).

Der Aktionsraum beträgt ~6 ha bei männlichen und ~4 ha bei weiblichen Tieren (Ahmad, 1994; Matsubayashi et al., 2003). Kleinkantschile werden meist einzeln angetroffen (>70%), seltener in Paaren (<30%) oder kleinen Gruppen (<5%) (Ahmad, 1994; Miura and Idris, 1999; Matsubayashi et al., 2006). Die jüngste Studie von Matsubayashi et al. (2006) zeigte, dass Kleinkantschile fakultativ einem monogamen oder polygynen Paarungssystem folgen können. Laut Robin (1988) werden primi- oder multipare Weibchen den nulliparen bevorzugt. Jungtiere werden vom Muttertier an geschützter Stelle abgelegt und während der ersten Lebenswoche ausschließlich zum Säugen aufgesucht (Ablieger). Das Säugen findet im Stehen mit einer hochgehobenen Hinterextremität statt. Ab der zweiten Lebenswoche folgt das Jungtier der Mutter bei der Nahrungssuche. Nach einer Säugeperiode von 10 bis 13 Wochen werden die Jungtiere entwöhnt und erreichen im Alter von drei bis fünf Monaten Geschlechtsreife (Robin, 1979; Kamis et al., 1994).

Vor allem bei männlichen Kleinkantschilen lassen Beobachtungen im Feld wie in Gefangenschaft auf eine ausgeprägte Intoleranz gegenüber gleichgeschlechtlichen Individuen schließen (Robin, 1979; Ahmad, 1994; Matsubayashi, 2006), ob jedoch von ausgesprochener Territorialität die Rede sein kann, wird von Ahmad (1994) in Frage gestellt.

Zur Verständigung und Demonstration der eigenen Präsenz werden Markierungen aus Harn, Kot und Drüsensekreten, vor allem der Intermandibulardrüsen und der des Analfeldes gesetzt. Eine akustische Kommunikation findet vornehmlich zwischen Mutter- und Jungtier statt, obgleich Trommeln mit den Hinterextremitäten und Fieplaute auch zum Repertoire adulter Tiere gehören (Robin, 1979 und 1988; Ahmad, 1994; Kamis, 1994).

Zu den natürlichen Feinden der Kleinkantschile gehören karnivore Säuger, vor allem katzenartige, Reptilien und Greifvögel. Wie bei vielen anderen Tierarten stellt jedoch der Mensch durch Habitatfragmentierung und -zerstörung die größte Bedrohung für diese Tierart dar (Kamis, 1994).

2.1.4 Bedeutung für den Menschen

Kleinkantschile gelten neben dem afrikanischen Kleinstböckchen (*Neotragus pygmaeus*) als kleinste Huftiere der Welt (Huffmann, 2007). Ähnlich dem Fuchs in der mitteleuropäischen Kultur wird dem Kleinkantschil im malaiischen Märchen mit der Figur des ‚Sang Kanchil‘ die Rolle des listigen Tieres mit dem scharfen Verstand zugesprochen (Mohd, 1976). Kleinkantschile gelten als leicht zähmbar und unkompliziert in der Haltung, wodurch sie vor allem im südostasiatischen Raum auch als Haus- und Labortier gehalten werden (National Research Council, 1991; Kudo et al., 1997).

2.1.5 Schutzstatus

Von den Einheimischen Malaysias und Indonesiens wurden Kleinkantschile zur Selbstversorgung mit Fleisch und Leder traditionell gejagt. Mittlerweile ist ihre Tötung gesetzlich untersagt (Kamis, 1994). Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Frage, wie sich die intensive Nutzung der südostasiatischen Wälder auf die Populationen einheimischer Tierarten auswirkt. Im Bezug auf den Kleinkantschil stellen Meijaard und Sheil (Meijaard et al., 2005; Meijaard und Sheil, 2008) einen deutlich negativen Trend hinsichtlich der Populationsdichten zwischen ursprünglichen oder Primär- und Sekundärwäldern fest.

Auf internationaler Ebene gelten Kantschile, bis auf *T. nigricans*, trotz großflächiger Rodungen des tropischen Regenwaldes und Bejagung der Tiere bislang als gering bedroht, jedoch ist für einige Arten eine Aktualisierung der Daten zu den Beständen in freier Wildbahn erforderlich (IUCN 2009).

2.2 Das Bovine Virusdiarrhoe Virus

2.2.1 Taxonomie: Genotypen, Spezies und Biotypen

Das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVDV) bildet zusammen mit dem Border Disease Virus (BDV) und dem Erreger der Klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus*, CSFV) das Genus Pestivirus innerhalb der Familie *Flaviviridae*. Zu dieser Familie werden auch die

Genera Flavivirus und Hepacivirus sowie die bislang nicht klassifizierten Viren GB Virus A und C gezählt (Thiel et al., 2005).

„Bovines Virusdiarrhoe Virus“ stellt einen Überbegriff für eine heterogene Gruppe, in Antigenität, Zytopathogenität und Virulenz variierender, einzelsträngiger RNA-Viren dar, für die auch der Begriff „Quasispezies“ verwendet wird (Bolin und Grooms, 2004). Eine Differenzierung erfolgt zumeist anhand von Sequenzvergleichen der konservierten, nichttranslatierten Region am 5'-Ende des Genoms. Alternativ und zur weiteren Unterscheidung werden auch die N^{pro}-, E2- und weitere Regionen des Genoms herangezogen (Rümenapf und Thiel, 2008).

Das BVDV wurde zunächst in zwei Genotypen eingeteilt: BVDV Genotyp I und BVDV Genotyp II (Ridpath et al., 1994; Ridpath und Bolin, 1998). Mittlerweile werden die Genotypen I und II als jeweils eigene Spezies, BVDV-1 und BVDV-2, anerkannt (Heinz et al., 2000). Für das sehr heterogene BVDV-1 werden weiterhin wenigstens 11 (a-k) (Vilček et al., 2001), für das BVDV-2 bislang wenigstens zwei Subtypen (Vilček et al., 2004) beschrieben. Die epidemiologische Bedeutung der verschiedenen Subtypen wird diskutiert (Ridpath, 2003; Bolin und Grooms, 2004; Vilček et al., 2005a). Serotypen werden für BVDV nicht definiert, da eine antigene Kreuzreaktivität nicht nur unter BVDV, sondern unter allen Pestiviren auftritt (Ridpath, 2003; Bolin und Grooms, 2004).

Phänotypisch und unabhängig von der BVDV-Spezies lassen sich Pestiviren anhand unterschiedlichen Verhaltens in der Zellkultur dem nichtzytopathogenen (nzp) oder dem zytopathogenen (zp) Biotyp zuordnen (Rümenapf und Thiel, 2008). Die in der Natur dominierenden nzp Stämme vermehren sich in permissiven Zellen, ohne makroskopisch oder mikroskopisch sichtbare Alterationen hervorzurufen. Zytopathogene Stämme dagegen verursachen einen zytopathischen Effekt (zpE), der sich in Form von Vakuolisierung des Zytoplasmas sowie Degeneration und Pyknose des Zellkerns manifestiert und schließlich den Tod der infizierten Zelle durch Apoptose herbeiführt (Grummer et al., 1998, 2002a und b; Zhang et al., 1996). Von praktischer Bedeutung ist, dass das Verhalten in Zellkultur nicht zwingend mit der Virulenz eines Stammes korreliert; alle bislang als hochvirulent eingestuft Stämme gehören dem nzp Biotyp an (Ridpath, 2003).

Neben BVDV-1 und -2, BDV und CSFV repräsentieren mehrere Virusisolate möglicherweise eigenständige Typen innerhalb des Genus Pestivirus: (1) ein 1969 aus einer Giraffe isolierter Stamm (Plowright, 1969), (2) ein dem Giraffenstamm ähnliches, aber aus einer bovinen Zellkultur stammendes Virus (Becher et al., 2003), (3) das aus einer Gabelantilope stammende Isolat ‚Antelope‘ (Vilček et al., 2005b), (4) ein aus fetalem Kälberserum isolierter Stamm namens ‚HoBi‘ (Schirrmeyer et al., 2004) sowie (5) die sog. „Tunisian Isolates“ (Rümenapf und Thiel, 2008) unterscheiden sich deutlich von allen bislang bekannten Genotypen und Spezies (Vilček und Nettleton, 2006; Rümenapf und Thiel, 2008).

2.2.2 Morphologie

Die Virionen des BVDV sind spherische Partikel mit einem Durchmesser von 40-60 nm. Zentral liegt ein etwa 30 nm messender Innenkörper aus RNA und Kapsid, der von einer

bilaminaren, lipidhaltigen Hülle umgeben wird. An der Oberfläche zeichnen sich 10-12 nm messende, ring-ähnliche Unterheiten sowie undeutliche Peplomere ab (Rice, 1996; Thiel et al., 1996).

2.2.3 Genom, Proteine und Replikation

Pestiviren besitzen eine einzelsträngige, lineare Ribonukleinsäure positiver Polarität, die aus etwa 12.300 Nukleotiden besteht. Die genomische RNA beinhaltet ein einzelnes offenes Leseraster, das für ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren kodiert und von nicht-kodierenden Abschnitten (*untranslated region*, UTR) von 372-385 bzw. 185-273 Nukleotiden Länge flankiert wird (Collett et al., 1988a, b, c und 1991; Brock et al., 1992) (Abb. 3). Weder 5'- noch 3'-UTR besitzen einen Polyadenylatschwanz, beide zeichnen sich aber durch charakteristische Primär- und Sekundärstrukturen aus, die essenzielle Signale für die virale Replikation und Proteinsynthese beinhalten (Rümenapf und Thiel, 2008).

Die Infektion der Zelle erfolgt als mehrstufige, Clathrin-abhängige Endozytose (Grummer et al., 2004; Lecot et al., 2005). Dieser folgt eine pH-abhängigen Fusion der Virushülle mit der Endosommembran, die zur Freisetzung des Kapsids ins Zytoplasma und zum „uncoating“ führt (Krey et al., 2005; Rümenapf und Krey, 2008). Während eine initiale Adsorption an die Zelloberfläche sowohl durch das Strukturprotein E^{ms} als auch durch das Strukturprotein E2 stattfindet, erfolgt die irreversible Bindung und Penetration der Zellwand erst über die Bindung des Strukturproteins E2 in Heterodimerformation mit E1 (Rümenapf und Thiel, 2008). Auf Seite der Wirtszelle wurden verschiedene Oberflächenmoleküle als Rezeptoren für das BVDV diskutiert (zusammengefasst u.a. bei Neill, 2005 oder Rümenapf und Thiel, 2008), eine funktionelle Beteiligung konnte jedoch allein für das CD46 *membrane cofactor* Protein nachgewiesen werden (Maurer et al., 2004; Krey et al., 2006; Rümenapf und Krey, 2008). CD46 wird auf allen Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten und bestimmter Zellen des ZNS exprimiert und fungiert als Membran-Kofaktor-Protein des C3b-Inaktivators Faktor I. Faktor I übt eine regulierende Wirkung beim Ablauf der Komplementkaskade aus und verhindert die Schädigung autologer Zellen. Zusätzlich gibt es jedoch eine Reihe von Hinweisen auf weitere, bislang unbekannte Rezeptoren und/oder Kofaktoren, die eine CD46-unabhängige Infektion ermöglichen (Rümenapf und Krey, 2008).

Nach dem „uncoating“ der viralen RNS im Zytoplasma der infizierten Zelle, initiiert die innerhalb der 5'UTR ausgebildete sog. interne Ribosomen-Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES) die Bindung an die 40s ribosomale Untereinheit des endoplasmatischen Retikulums (Rümenapf und Thiel, 2008). Ausgehend von der viralen RNS wird ein Polyprotein synthetisiert, das ko- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in die Virusproteine gespalten wird (Abb. 3).

Das erste Proteinprodukt ist das N^{pro}, ein Nichtstrukturprotein mit autoproteolytischer Aktivität, das nur bei Pestiviren, nicht bei anderen Genera der Familie Flaviviridae, vorkommt (Wiskerchen et al., 1991a; Rümenapf et al., 1993). Das folgende, basische Strukturprotein C (*core*) formt im Virion das Kapsid und bindet die zentral verborgene virale RNA (Murray et al., 2008).

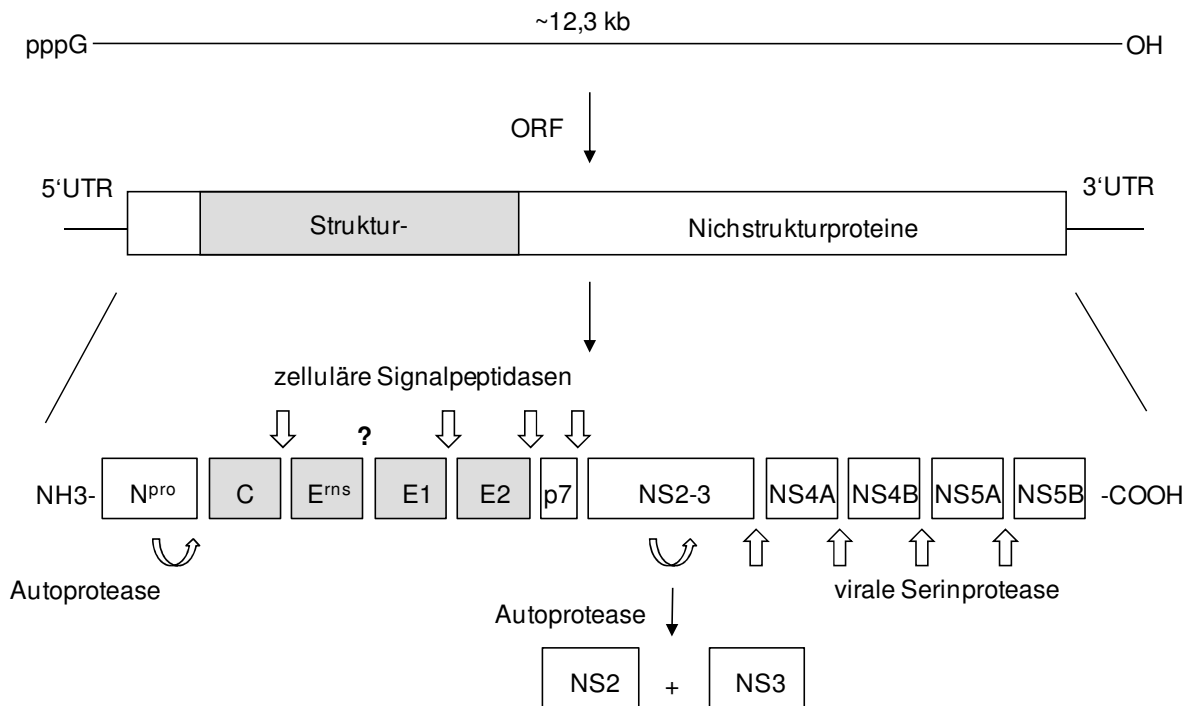


Abb. 3: Genomaufbau und Polyproteinprozessierung von Pestiviren
(nach Rümenapf und Thiel (2008); modifiziert)

Die glykosylierten Strukturproteine E^{rns} , E1 und E2 (*envelope*) bilden über Disulfidbrücken verknüpfte Homo- (E^{rns} - und E2-) und Heterodimere (E1/E2- sowie $E^{rns}/E2$ -), wobei das E1/E2-Heterodimer die prädominante Glykoproteinform darstellt (Weiland et al., 1990; Lazar et al., 2003). E^{rns} (*envelope, RNase, soluble*) stellt wie N^{pro} ein einzig bei Pestiviren auftretendes Proteinprodukt dar. Es besitzt die Fähigkeit RNA zu binden sowie Ribonuklease-Aktivitäten (Schneider et al., 1993), ist eine der immunogenen Determinanten der Pestiviren (Windisch et al., 1996) und wird nach Infektion der Zelle in den Extrazellularraum sezerniert, so dass es im Überstand von Zellkulturen wie im Blut infizierter Tiere detektiert werden kann (Rümenapf et al., 1993; Hulst und Moormann, 2001). Im Gegensatz zu E^{rns} sind die Strukturproteine E1 und E2 fest in der Virushülle verankert (Weiland et al., 1990). E2 stellt das immundominante Strukturprotein dar (Bolin und Ridpath, 1989; Donis et al., 1991) und fungiert nach Liang et al. (2003) als Determinante für den Wirt- und Zelltropismus von Pestiviren.

Auf die vier Strukturproteine folgt in Richtung C-Terminus ein mit p7 bezeichnetes Polypeptid, dem aufgrund seiner Fähigkeit Ionenkanäle zu formen eine Rolle bei der Elution der Nachkommenviren und/oder bei der Penetration von Zellen zugesprochen wird (Rümenapf und Thiel, 2008).

Dem folgenden NS2-3-Protein kommt eine besondere Bedeutung zu, da anhand seiner Prozessierung zwischen den Biotypen nzp und zp unterschieden wird und die Effizienz seiner Prozessierung somit die Auswirkung der Infektion auf die infizierte Zelle festlegt. Entgegen der langjährigen Annahme, dass nur zp BVDV freies NS3 exprimieren, konnten Lackner et al. (2004 und 2005) demonstrieren, dass auch in mit nzp BVDV infizierten Zellen

gespaltenes NS3 auftritt. Die intramolekulare Spaltung von NS2-3 in NS2 und NS3 wird durch eine im NS2 kodierte Autoprotease katalysiert, wobei ein zelluläres Chaperon aus der Familie der J-Domänenproteine („Jiv“) einen essenziellen Kofaktor darstellt (Lackner et al., 2004 und 2005). Im Hinblick auf die zytopathogene Wirkung von freiem NS3 ist jedoch von entscheidender Bedeutung, dass die Aktivität der NS2-Autoprotease von nzp Stämmen durch die Verfügbarkeit von „Jiv“ zeitlich reguliert wird, während diese Regulation bei zp Stämmen durch unterschiedlichste, im Genom verankerte Mechanismen aufgehoben wird. Bei den genomischen Veränderungen, die zu einem Wechsel des Biotyps von nzp zu zp führen, kann es sich um Insertion zellulärer Sequenzen (häufig Ubiquitin, ubiquitin-ähnliche Sequenzen oder Jiv-Insertionen), Duplikation oder Rearrangement viraler Sequenzen (z.B. der von N^{pro} und/oder NS3), Deletionen (u.a. der Strukturproteine, p7 und NS2) und/oder Punktmutationen (v.a. im Bereich von NS2) handeln. Allen phänotypisch in Erscheinung tretenden und bislang untersuchten Mutationen zp Stämme gemein ist, dass sie durch Freisetzung des N-Terminus und direkte Translation von NS3 oder durch die permanente Aktivierung der Autoprotease NS2 mit erhöhter Expression von NS3, erhöhter RNA-Replikation und Zytopathogenität korrelieren (Rümenapf und Thiel, 2008). NS3 besitzt Serin-Protease-Aktivität, zusammen mit dem Nichtstrukturproteine NS4A katalysiert es die Prozessierung aller in 3'-Richtung gelegenen viralen Proteine (Tautz et al., 1997 und 2000), RNA-Helikase- und RNA-abhängige NTPase-Aktivität (Tamura et al., 1993; Warrener und Collett, 1995).

Während die Bedeutung der Vorläuferproteine NS4AB und NS5AB sowie die der prozessierten Nichtstrukturproteine NS4B und NS5A nicht genau bekannt ist (Rümenapf und Thiel, 2008), bilden NS4A, NS4B, NS5A und NS5B gemeinsam mit NS3 den viralen Replikationskomplex (Behrens et al., 1998). Die Replikation des BVDV findet an zytoplasmatischen Membranen statt und verläuft nach einem semikonservativen, asymmetrischen Modell (Warrilow et al., 2000). Das NS5B fungiert als RNA-abhängige RNA-Polymerase (Zhong et al., 1998) und katalysiert die Transkription des Positivstrangs in einen komplementären Negativstrang, der wiederum als Matrize für die exzessive Synthese neuen, positiv-orientierten Virusgenoms dient.

Morphogenese und Maturation der Virionen erfolgen unter dem Einfluss des Kapsidproteins (Murray et al., 2008) sowie der Nichtstrukturproteine NS2-3 (Agapov et al., 2004) und NS5B (Ansari et al., 2004). Während sich generierte Nukleinsäuren und Kapsidproteine im Zytoplasma der infizierten Zelle zum Zusammenbau von Nukleokapsiden versammeln, erfolgen an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums Glykosylierung und Faltung der Hüllproteine (Rümenapf und Thiel, 2008). Durch Knospung (*budding*) kommt es zur Aufnahme von Nukleokapsiden mit virusspezifischer Hülle in die Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. Die reifenden Partikel werden in Vesikel eingeschlossen, zum Golgi-Apparat transportiert, und infektiöses Virus mittels Exozytose in den Extrazellularraum freigesetzt (Grummer et al., 2001).

2.2.4 Folgen der Virusinfektion auf zellulärer Ebene

Subversion des nativen Immunsystems

Während beide Biotypen des BVDV eine transiente Infektion hervorrufen können, sind allein nzp BVDV in der Lage, eine persistierende Infektion im Fetus zu etablieren. Charakteristikum einer persistierenden Infektion durch BVDV ist eine hochspezifische Immuntoleranz des Wirtes gegenüber dem persistierenden Virusstamm, die dadurch erzielt wird, dass das BVDV den Wirt in der Frühphase seiner intrauterinen Entwicklung, vor Ausreifung des adaptiven Immunsystems infiziert (Potgieter, 1995; Chase et al., 2004) (siehe auch Kapitel 2.3.3). Wie das native Immunsystem, vor allem die Produktion von Klasse-I-Interferonen (u.a. IFN α , β , τ , ω), bei Etablierung und Erhaltung einer persistierenden BVDV-Infektion umgangen wird und warum nur nzp BVDV dazu befähigt sind, war und ist noch immer Gegenstand der Forschung. Schlüsselemente waren bislang die Funde, dass (1) im Fetus allein nzp BVDV in der Lage sind, eine dsRNA induzierte Synthese von IFN- α/β zu unterbinden, während zp BVDV eine IFN-Synthese provozieren, (2) mit nzp BVDV persistent infizierte Zellen gegenüber dsRNA, dem stärksten Alarmsignal für eine Virusinfektion, vollkommen resistent sind und (3) nzp BVDV auch durch hohe Dosen von Interferon nicht aus einer persistent infizierten Zelle eliminiert werden kann (Schweizer und Peterhans, 2001; Schweizer et al., 2006; Peterhans et al., 2003, 2006 und 2008).

Detaillierte *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen ermöglichten eine Charakterisierung der viralen Komponenten, die BVDV zur Subversion des nativen Immunsystems befähigen. Ein Ansatzpunkt des BVDV scheint im *interferon regulatory factor-3* (IRF-3) zu liegen, einem von wenigstens vier Transkriptionsfaktoren bei der IFN-Synthese, der durch die virale Protease N^{pro} blockiert und dem Abbau durch Proteasomen zugeführt wird (Hilton et al., 2006). Neben N^{pro} spielt höchstwahrscheinlich das Strukturprotein E^{ns} eine entscheidende Rolle. E^{ns} besitzt die Fähigkeit dsRNA zu binden, zu degradieren und so eine dsRNA-stimulierte IFN-Produktion zu verhindern (Iqbal et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass während N^{pro} die IFN-Synthese in infizierten Zellen unterbindet, E^{ns} eine konstante, dsRNA-induzierte IFN-Synthese in nicht-infizierten Zellen einschränkt (Mätzener et al., 2009; Magkouras et al., 2008; Meyers et al., 2007). Untersuchungen von Franchini et al. (2006) und Lee et al. (2008) geben ferner Hinweise darauf, dass BVDV das native Immunsystem auch durch Modulation der Signalübertragung von „Toll-like“-Rezeptoren unterwandern könnte.

Zytopathogene Effekte

Im Gegensatz zu nzp BVDV haben zp BVDV die Fähigkeit verloren, eine Zelle zu infizieren ohne den Tod der Zelle zu verursachen (Neill, 2005). Die bislang augenfälligsten Auslöser des Zelltods durch zp BVDV sind die genomischen Veränderungen, die zu einer andauernden Aktivierung der NS2-Autoprotease oder zu einer permanenten direkten Freisetzung von NS3 führen. Es wurde postuliert, dass NS3 direkt zytopathogen wirkt (St. Louis et al., 2005). Alternativ könnte auch die mit vermehrter NS3-Expression einhergehende verstärkte Replikation und Akkumulation von dsRNA verantwortlich sein, die auf unterschiedlichen Wegen über die Aktivierung der Caspase-Kaskade die Apoptose

herbeiführen (Grummer et al., 1998, 2002a und b; Zhang et al., 1996; Hoff und Donis, 1997; Lambot et al., 1998; Schweizer und Peterhans, 1999; Jordan et al., 2002). Qu et al. (2001) gelang es jedoch, einen nzp BVDV-Biotyp zu selektieren, der zum zp Elternvirus vergleichbare Mengen an NS3 und dsRNA generierte. Wahrscheinlich führte eine Mutation am NS4B zu dieser Attenuierung. Da NS4B beim verwandten Hepatitis C Virus in die Reorganisation von Membranen involviert ist und BVDV über ER-Stress die Apoptose induzieren kann, sind zytopathogene Effekte nach Rümenapf und Thiel (2008) wahrscheinlich das indirekte Ergebnis einer Überbeanspruchung zellulärer Membranen.

Modulation des Zellstoffwechsels und Umgestaltung der Zelle

Anhand vergleichender Studien konnte gezeigt werden, dass nzp BVDV durch eine Herabsetzung der Tubulinsynthese die Struktur des Zytoskeletts verändern und die Expression von Genen, deren Produkte an Proteinsynthese und -prozessierung beteiligt sind, stimulieren können (Neill, 2005). Zytopathogene BVDV dagegen führen zur Veränderung von Proteinen, die im Zusammenhang mit Funktionen der nativen Immunantwort wie Zelladhäsion, -migration, Antigenaufnahme und -präsentation stehen. Es wird vermutet, dass die Infektion mit zp BVDV zu unkontrollierten Entzündungsreaktionen führt und antivirale Mechanismen und die Vermittlung einer spezifischen Immunreaktion negativ beeinflusst werden (Pinchuk et al., 2008; Lee et al., 2009).

2.2.5 Tenazität

Wie alle behüllten Viren werden auch Pestiviren durch sämtliche gängige Desinfektionsmittel inaktiviert. Darüber hinaus können Trypsin- oder Ethyleniminbehandlung sowie Elektronen- oder Gammabestrahlung zur Inaktivierung eingesetzt werden (Ridpath, 2005). Während die Infektiosität durch Einfrieren nicht beeinträchtigt wird, nimmt sie bei Temperaturen >40°C ab und erlischt bei 56°C nach 45 Minuten (Heinz et al., 2000). Im Vergleich zu anderen Flaviviren zeigen Pestiviren eine bemerkenswerte Säurestabilität (Rümenapf und Thiel, 2008).

2.3 Die Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease

Die Bovine Virusdiarrhoe (BVD) (Olafson et al., 1946) ist eine enzootisch verlaufende Infektionskrankheit des Rindes, deren Verlauf in Abhängigkeit zu verschiedenen beim Virus wie beim Wirt liegenden Faktoren steht und sich in unterschiedlichen Formen manifestieren kann. Bei postnataler Erstinfektion immunkompetenter Rinder kommt es zu einem transienten Verlauf, der von der Virulenz des Virusstammes, der Immunkompetenz, dem Immunstatus, dem Trächtigkeitszustand sowie der Konstitution des Tieres, der Immunitätslage in der Herde und Kofaktoren wie Fütterungs- und Haltungsbedingungen abhängig ist (Baker, 1995). Von großem epidemiologischem Einfluss sind die Infektion empfänglicher, gravider Rinder und die pränatale, transplazentare Infektion des Embryos/Fetus, die in Abhängigkeit von dessen Entwicklungsstadium zur Etablierung einer persistierenden Infektion führen können (Moennig und Liess, 1995; Grooms, 2004). Einzig

persistent infizierte (PI) Tiere können nach endo- oder exogener (Super-) Infektion mit dem zp Biotyp des BVDV an Mucosal Disease (MD) erkranken (Bolin, 1995) (Abb. 4).

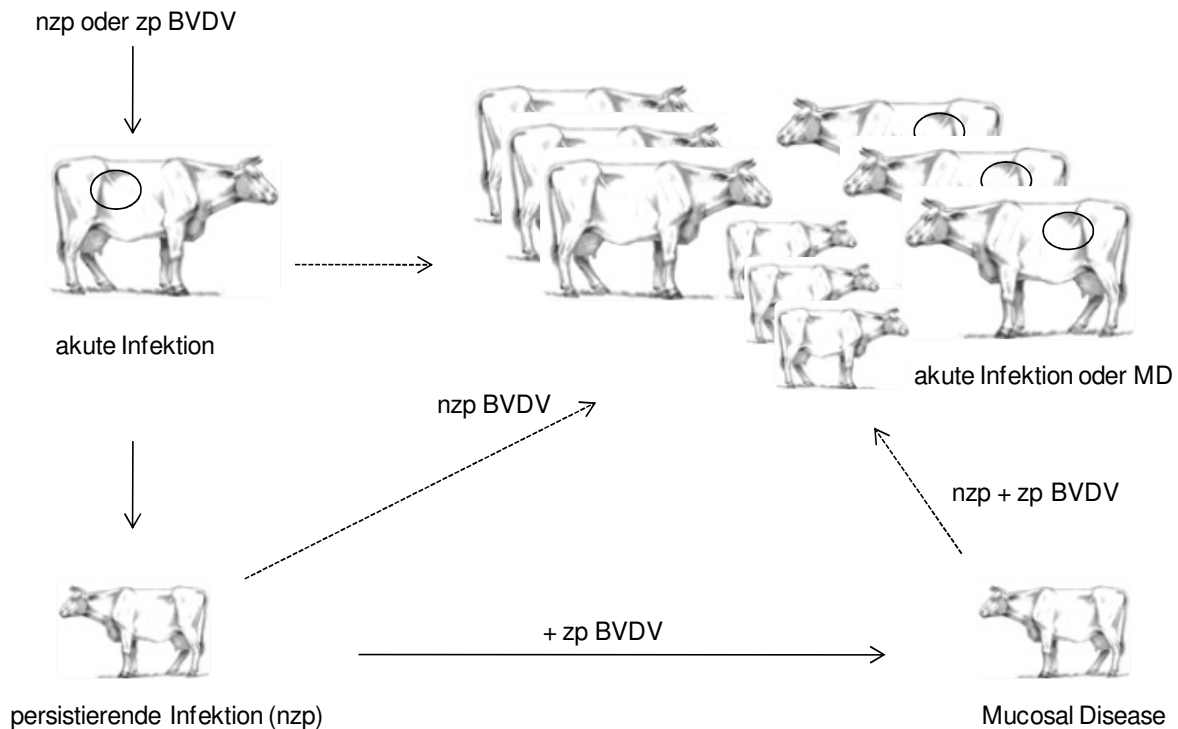


Abb. 4: Zirkulation des BVDV in einem Rinderbestand
(modifiziert nach Liebler-Tenorio, 2005; Illustration aus Szunyogy und Fehér, 1996)

Bedeutung erlangt die BVD vor allem durch die wirtschaftlichen Einbußen, die Landwirte nach Infektion ihres Bestandes zu verzeichnen haben. Obgleich die Morbidität vergleichsweise gering ist, variieren Seroprävalenzen in europäischen Rinderbeständen je nach Region, Herdenstruktur und bisherigen Bekämpfungsmaßnahmen zwischen <1% (Finnland) über 46% (z.B. Österreich) und 60-80% (Deutschland) bis zu 95% (England) (Brendel et al., 2005). Die Prävalenz persistierender Infektionen liegt regional unterschiedlich bei 0,75-2% (Houe, 2005). Das Auftreten der MD wird als ‚sporadisch‘ bezeichnet, erreicht aber 100% Mortalität (Thiel et al., 1996).

2.3.1 Epidemiologie

Die Übertragung des BVDV ist sowohl direkt als auch indirekt möglich. Persistent infizierte Tiere, die Virus in allen Sekreten und Exkreten lebenslang und im Vergleich zu transient infizierten Tieren in wesentlich größeren Mengen ausscheiden, stehen im Mittelpunkt des epidemiologischen Geschehens (Houe, 1995; Thurmond, 2005). Erzeugen PI Kühe ihrerseits Nachkommen, sind diese unweigerlich ebenfalls PI, was zur Bildung sogenannter „virämischer Linien“ führt (Doll und Moennig, 2002). Meist erfolgt eine Infektion auf oronasalem Weg. Maul-zu-Maul oder Nase-zu-Nase Kontakt sind die effektivsten Übertragungswege (Houe, 1995; Thurmond, 2005). Neben der oronasalen Aufnahme aus

Speichel, Tränenflüssigkeit, Urin, Kot, Nachgeburten, Lochien und Milch kann das Virus auch über den Genitaltrakt durch das Ejakulat persistent oder transient infizierter Bullen, beim Embryotransfer (Givens und Waldrop, 2004) oder über den distalen Abschnitt des Verdauungskanals bei der rektalen Untersuchung verbreitet werden (Thurmond, 2005). Als Vektoren für eine indirekte Übertragung spielen vor allem kontaminierte Kleidung, Untersuchungshandschuhe, Instrumente, Transportfahrzeuge, Futtermittel sowie Lebendvakzine eine bedeutende Rolle (Doll und Moennig, 2002; Grooms et al., 2002). Experimentell erfolgte eine Übertragung auf aerogenem Weg (Mars et al., 1999; Niskanen und Lindberg, 2003) sowie durch Arthropoden der Gattungen *Stomoxys* und *Haematopota* (*S. calcitrans* und *H. pluvialis*) (Tarry et al., 1991). Desweiteren wurden die Euterfliege (*Hydrotea irritans*) sowie die Augenfliege (*Musca autumnalis*) als mögliche mechanische Vektoren angenommen (Tarry et al., 1991; Gunn, 1993).

2.3.2 Verlaufsformen bei postnataler Erstinfektion

Die Inkubationszeit einer akuten BVDV-Infektion beträgt ca. 3-7 Tage (Doll und Moennig, 2002; Grooms et al., 2002). Transiente BVDV-Infektionen verlaufen zu 70-90% subklinisch. Nach Erstkontakt mit hochvirulentem BVDV kommt es gelegentlich zu mehr oder weniger schweren Durchfällen, die von hohem Fieber, Leukopenie, Apathie, Anorexie, Augen- und Nasenausfluß und eventuell Läsionen der Schleimhäute begleitet werden. Perakute Verläufe, die binnen 48 Stunden zum Tod des Tieres führen können, werden als schwere akute BVD bezeichnet und sind mit dem BVDV-2 assoziiert. Als „Hämorrhagisches Syndrom“ wird ein vor allem bei Kälbern und Jungrindern auftretendes Krankheitsbild bezeichnet, das infolge hochgradiger Thrombozytopenie zur hämorrhagischen Diathese mit petechialen bis flächenhaften Blutungen in oder aus der Haut und den Schleimhäuten führen kann. Unbehandelt führt diese Verlaufsform, die ebenfalls mit Infektionen durch das BVDV-2 assoziiert wird, in 50-70% der Fälle zum Tod des Tieres (Doll und Moennig, 2002; Grooms et al., 2002). Unabhängig von der klinischen Symptomatik, führt die transiente Infektion mit BVDV, das sich vornehmlich in Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, CD4+- wie CD8+-T-Lymphozyten und B-Zellen repliziert, zu mehr oder weniger ausgeprägten, quantitativen und qualitativen Störungen der Immunabwehr, die zu einer Prädisposition für Sekundär- und/oder Koinfektionen vor allem des Respirations- und Verdauungstrakts führt (Kapil et al., 2005; Liebler-Tenorio, 2005).

Dauer und Heilung einer transienten BVDV-Infektion sind von der Virulenz des infizierenden Stammes, der Dauer der Virämie, dem Vorliegen von Sekundär- und/oder Koinfektionen, dem Regenerationsvermögen der betroffenen Gewebe und der Konstitution des Tieres abhängig. Im Allgemeinen erholen sich die Tiere innerhalb von 2-4 Wochen und humorale und zelluläre Immunantwort führen zur Elimination des Virus und zum Aufbau einer spezifischen Immunität (Evermann und Barrington, 2005). Spezifische Antikörper sind etwa ab dem 10. Tag *p.i.* messbar, maximale Titer werden jedoch erst ca. 10 Wochen *p.i.* erreicht (Wolf, 2008).

Über die beschriebenen Krankheitsbilder hinaus, kann eine Infektion mit dem BVDV zu schweren Reproduktionsstörungen führen. Sowohl zp als auch nzp BVDV können die unterschiedlichen Gewebe der Ovarien sowie einzelne Oozyten infizieren, dabei die Follikelreifung beeinträchtigen, hormonelle Imbalancen hervorrufen und zu herabgesetzten Konzeptionsraten bis zur Infertilität führen. Im männlichen Genitaltrakt vermehrt sich das Virus sowohl in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen als auch in Nebenhoden und Hoden und wird mit dem Sperma freigesetzt. Die Qualität des Spermas transient infizierter Bullen kann dadurch nachhaltig beeinträchtigt sein und zu reduzierten Befruchtungsraten führen (Grooms, 2004; Brock et al., 2005). Vor allem epidemiologisch bedeutsam war die Feststellung, dass BVDV im Hodengewebe transient infizierter Bullen noch Monate nach Ende der Virämie nachgewiesen werden kann (Givens et al., 2003).

2.3.3 Verlaufsformen bei pränataler Erstinfektion

Von zentraler Bedeutung für die Epidemiologie und Pathogenese der BVD/MD ist die Infektion gravider Rinder. Während das Muttertier theoretisch an jeder der oben beschriebenen Verlaufsformen erkranken kann, aber in der Regel symptomlos serokonvertieren wird (Doll und Moennig, 2002), hat die Infektion in Abhängigkeit von Trächtigkeitsstadium sowie Biotyp und Virulenz des Erregers, unterschiedliche immunologische und teratogene Auswirkungen auf den Embryo bzw. Fetus (Moennig und Liess, 1995; Larson, 2005) (Abb. 5).

Frühe embryonale Stadien scheinen für das Virus nicht empfänglich zu sein (Liebler-Tenorio, 2005): eine protektive Wirkung der *Zona pellucida* (Liebler-Tenorio, 2005; Brock et al., 2005) wie eine schützende Wirkung des vom bovinen Trophoblasten gebildeten, antiluteolytisch und antiviral wirksamen Interferon-T (Swasdipan et al., 2002; Peterhans et al., 2003) werden diskutiert. Jedoch können BVDV-bedingte, pathologische Veränderungen an Ovar und Uterus Dysfunktionen und hormonelle Imbalancen verursachen, die eine erfolgreiche Implantation verhindern, und zur Resorption der Frucht führen (Brock et al., 2005; Liebler-Tenorio, 2005). Der Embryo selbst wird erst nach Implantation mit Ausbildung der fetalen Kotyledonen um den ~30. Tag *p.c.* empfänglich (Brock et al., 2005; Liebler-Tenorio, 2005).

Während des ersten Drittels der Trächtigkeit trifft eine transplazentare Infektion auf einen immunologisch inkompetenten Fetus (Moennig und Liess, 1995; Grooms, 2004; Brock et al., 2005). Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass das BVDV die Plazentaschranke mit nahezu 100%iger Effektivität passiert (Evermann und Barrington, 2005). In Abhängigkeit von Biotyp und Virulenz des BVDV sowie vom Entwicklungsstadium des Fetus kann es zur Etablierung einer persistierenden Infektion (siehe Kap. 2.3.4), zur Resorption, zum Abort oder zur Mumifikation des Fetus kommen. In geringerem Maß treten in der frühen Phase der Trächtigkeit teratogene Effekte auf (Moennig und Liess, 1995; Grooms, 2004; Brock et al., 2005). Obgleich Aborte durch das BVDV überwiegend im ersten Trimester der Trächtigkeit auftreten, sind sie auch zu späteren Zeitpunkten möglich. Die Pathogenese des Aborts durch das BVDV ist unklar, doch deuten Untersuchungen tot geborener Feten und experimentelle Studien darauf hin, dass es sich weniger um

LITERATURÜBERSICHT

pathologische Prozesse an Plazenta und/oder Uterus handelt als um eine direkte, eventuell immunvermittelte Schädigung des Fetus. Läsionen an Plazenta und/oder Uterus können jedoch die Replikation des Virus begünstigen und opportunistischen Erregern eine Eintrittspforte bieten (Liebler-Tenorio, 2005).

Eine transplazentare Infektion des Fetus zwischen dem 80. und 150. Tag *p.c.* hat meist teratogene Effekte zur Folge, die sich in kongenitalen Missbildungen manifestieren (Moennig und Liess, 1995; Grooms, 2004; Brock et al., 2005). Zusätzlich zur direkt schädigenden Wirkung des Virus kann die einsetzende Immunkompetenz des Fetus Entzündungsreaktionen hervorrufen und die Organogenese empfindlichst beeinflussen (Moennig und Liess, 1995). Das Zentralnervensystem und die Augen sind am häufigsten betroffen. Am Gehirn finden sich Kleinhirnhypoplasie oder -aplasie, Mikroenzephalie, Hydranenzephalie, Porenzephalie, Hydrozephalus internus oder auch Dys- oder Hypomyelogenese. Am Auge werden häufig Hypochromasie der Iris, Katarakte, Retinaatrophie oder -dysplasie, Hypoplasie oder Neuritis des N. opticus sowie Mikrophtalmie diagnostiziert (Baker, 1995; Moennig und Liess, 1995; Bielefeldt-Ohmann, 1995; Grooms, 2004). Sind sowohl das ZNS als auch die Augen von teratogenen Effekten betroffen, wird vom „okulozerebellären Syndrom“ gesprochen (Bielefeldt-Ohmann, 1984). Daneben werden Hypoplasie von Thymus und/oder Lunge, Alopezie oder Hypotrichose, Brachygnathia inferior, Osteochondrosis, Arthrogryposis, gestörte Osteogenese sowie generalisierte Wachstumshemmung mit einer Schädigung durch das BVDV assoziiert (Baker, 1995; Moennig und Liess, 1995; Bielefeldt-Ohmann, 1995; Grooms, 2004; Brock et al., 2005).

Ab dem ~90. Tag der Trächtigkeit ermöglicht das Immunsystem des Rinderfetus eine aktive Auseinandersetzung mit dem BVDV. Die Bildung präkolostral neutralisierender Antikörper und Eliminierung des Virus führen zur Geburt Antikörper-positiver, missgebildeter oder klinisch gesunder Kälber (Moennig und Liess, 1995; Grooms, 2004; Brock et al., 2005), die jedoch vergleichenden Untersuchungen zufolge schlechtere Wachstumsraten, erhöhte Krankheitsprädisposition und eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als nicht-infizierte, Antikörper-negative Kälber (Muñoz-Zanzi et al., 2003).

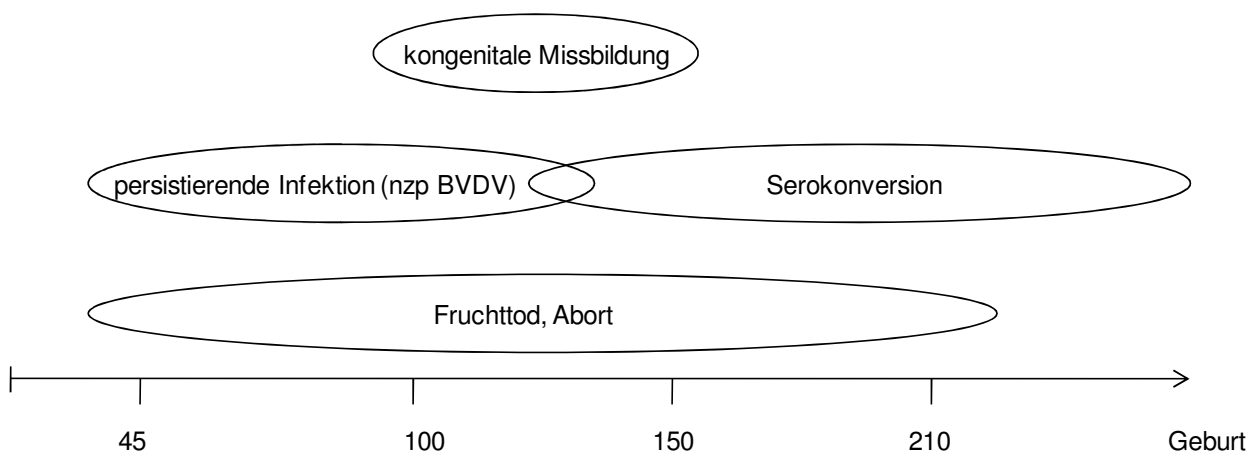


Abb 5: Auswirkungen der intrauterinen BVDV-Infektion in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium (nach Larson, 2005)

Ogleich beide Biotypen des BVDV den Fetus infizieren können, ist allein nzp BVDV in der Lage eine persistierende Infektion zu etablieren; eine intrauterine Infektion mit zp BVDV führt entweder zum frühzeitigen Absterben der Frucht, zum Abort oder zur Bildung präkolostral neutralisierender Antikörper (Brownlie et al., 1989; Moennig und Liess, 1995; Brock et al., 2005). Neben beiden Biotypen können auch beide Spezies des BVDV transplazentale Infektionen verursachen, und auch zeitgleiche Infektionen mit beiden Spezies sind beschrieben (Liebler-Tenorio, 2005).

2.3.4 Persistierende Infektionen

Rinderfeten, die eine Infektion mit nzp BVDV vor dem 125. Tag überleben, entwickeln eine Toleranz gegenüber dem Erreger und sind fortan persistent mit BVDV infiziert (Potgieter, 1995; Chase et al., 2004). Das Phänomen der immunologischen Toleranz wurde seit den 1960er Jahren vermutet (Bürki und Germann, 1964; Malmquist, 1968; Johnson und Muscoplat, 1973), 1978 das erste Mal in einem klinisch gesunden Bullen beschrieben (Coria und McClurkin, 1978) und nachfolgend experimentell reproduziert (McClurkin et al., 1984; Liess et al., 1984).

Etablierung und Erhalt einer persistierenden Infektion

Die Ausbildung einer spezifischen Immuntoleranz und persistierenden Infektion im Rinderfetus kann auf mehreren Wegen erfolgen: über eine transiente BVDV-Infektion des Muttertieres, wenn das Muttertier selber PI ist (Moennig und Liess, 1995; Thurmond, 2005) oder über das Ejakulat eines transient oder persistent infizierten Bullen (Brock et al., 2005).

Bis zum ~125. Tag der Trächtigkeit befindet sich das spezifische Immunsystem des Rinderfetus in der Prägephase; das antigene Profil des Virus wird als körpereigen („selbst“) angesehen (Potgieter, 1995; Chase et al., 2004) und, während sich BVDV in allen endo-, meso- und ektodermalen Geweben vermehrt (Wolf, 2008), werden sämtliche gegen das persistierende BVDV gerichteten T- und B-Zellen im Rahmen des Erwerbs der Selbsttoleranz eliminiert. Kommt es postnatal zu einer Super- oder Sekundärinfektion mit einem anderen BVDV, werden antigene Determinanten, die dieser Stamm mit dem persistierenden BVDV gemein hat, toleriert, während das Immunsystem auf fremde antigene Determinanten mit der Bildung von Antikörpern reagiert (Potgieter, 1995; Chase et al., 2004). Auf immunologischer Ebene wird als wichtigster Mechanismus zum Erhalt einer persistierenden Infektion die hochspezifische Toleranz durch CD4+-T-Zellen angesehen (Collen et al., 2000; Chase et al., 2004). Nach Untersuchungen durch Collen et al. (2000) kann jedoch die Änderung von nur 1% der Aminosäuren ausreichend sein, um im PI-Tier eine zellgestützte Immunantwort zu induzieren. Dies erklärt, warum heranwachsende PI-Tiere auf eine der vielen möglichen BVDV-Quasiespezies, die endogen im Laufe der Zeit entstehen, mit der Bildung von Antikörpern reagieren können (Collins et al., 1999; Collen et al., 2000). Die Bildung von Immunkomplexen, die gelegentlich in Keimzentren lymphatischer Gewebe von PI-Tieren beobachtet wird, gibt Hinweise darauf, dass auch in PI-Tieren eine B-Zell-Reaktion stattfinden kann. Ursächlich wird sie auf die Variation antigenen Determinanten, v.a. des E2-Strukturproteins (Collins et al., 1999), oder eine möglicherweise unvollständige

Toleranz durch B-Lymphozyten zurückgeführt (Fray et al., 2000). Die fehlende oder geringe Produktion zirkulierender Antikörper wird durch mangelhafte Proliferation von B-Lymphozyten bei gleichzeitigem Vorhandensein großer Mengen löslichen Antigens (E^{ms}) erklärt (Fray et al., 2000; Chase et al., 2004).

Wie das native Immunsystem bei Etablierung und Erhalt einer persistierenden BVDV-Infektion umgangen wird, war und ist noch immer Gegenstand der Forschung. Im immunkompetenten Tier ist die Aktivierung des unspezifischen, nativen Immunsystems Voraussetzung zur Auslösung einer spezifischen oder adaptiven Immunantwort (Janeway et al., 2002). Zellen aus einem frühen Fetus sind bereits in der Lage, bei einer Virusinfektion Interferon α/β zu bilden (Brackenbury et al., 2005; Peterhans et al., 2003, 2006 und 2008), d.h. das native Immunsystem wird während der Ontogenese früher ausgebildet als das adaptive Immunsystem. Nach Infektion mit nzp BVDV, nicht jedoch mit zp BVDV, wird die Induktion von Interferon in infizierten fetalen Zellen durch einen sehr speziellen Mechanismus unterwandert (siehe Kapitel 2.2.4), was eine Grundvoraussetzung zur Etablierung einer persistierenden Infektion zu sein scheint (Charleston et al., 2001 und 2002; Schweizer und Peterhans, 2001; Chase et al., 2004). Bei bestehender persistierender Infektion geben *in vitro*- wie *in vivo*-Untersuchungen Hinweise darauf, dass Interferon-vermittelte Aktivitäten BVDV auch nicht aus PI-Zellen entfernen. Möglicherweise stellt diese fehlende Interferon-Wirkung auf BVDV sicher, dass das persistierende Virus auch bei Infektion durch andere Viren, die in nicht-BVDV-infizierten Zellen sehr wohl eine Interferonproduktion induzieren, nicht eliminiert wird (Peek et al., 2004; Schweizer et al., 2006; Peterhans et al., 2008).

Klinik und Pathologie

Einzelne PI-Kälber fallen schon bei der Geburt durch unterschiedlich stark ausgeprägte kongenitale Mißbildungen, struppiges Haarkleid, disproportionierten Körperwuchs, vermindertes Stehvermögen, Ataxie oder geringes Geburtsgewicht auf, sind lebensschwach und sterben unter Umständen innerhalb weniger Stunde oder Tage (Doll und Moennig, 2002; Grooms et al., 2002). Die meisten PI-Kälber werden jedoch normal entwickelt und klinisch gesund geboren (Baker, 1995; Doll und Moennig, 2002; Stokstad und Løken, 2002) und zeigen erst in ihrer weiteren Entwicklung verschiedene funktionelle Defekte, wie schlechtere Wachstumsraten, geringere Gewichtszunahmen als virusfreie Tiere gleichen Alters und/oder erhöhte Krankheitsanfälligkeit („Kümmerer“) (Stokstad und Løken, 2002; Liebler-Tenorio, 2005). Weiterhin können intermittierender Nasenausfluß, vorübergehende Erosionen an Flotzmaul, Zunge und im oberen Verdauungstrakt sowie Hautläsionen, v.a. in den Interdigitalspalten, beobachtet werden. Auch intermittierende Fieberschübe und Episoden katarrhalischer Diarrhoe können auftreten (Doll und Moennig, 2002; Grooms et al., 2002; Stokstad und Løken, 2002). Im ersten Lebensjahr werden Mortalitätsraten von bis zu 50% beschrieben, sei es, dass die PI Tiere an Sekundärinfektionen sterben oder aufgrund zu geringer Zuwachsraten vorzeitig geschlachtet werden (Houe, 1995). Ähnlich transient infizierten Tieren, wird auch bei PI Tieren eine mehr oder weniger ausgeprägte Immunsuppression beobachtet, obgleich diese weniger auf quantitative als auf qualitative Störungen der Immunabwehr zurückgeführt wird (Potgieter, 1995; Kapil et al., 2005). Nur

gelegentlich werden auch in PI Individuen Leuko-, Granulozyto- und/oder Monozytopenie beobachtet (Piccinini et al., 2006). Vorwiegend werden Verschiebungen einzelner Lymphozytensubpopulationen (Bolin et al., 1985a; Larsson, 1988; Piccinini et al., 2006), eingeschränkte antimikrobielle Wirkung immunkompetenter Zellen (Roth et al., 1986; Brown et al., 1991; Piccinini et al., 2006) und/oder eine eingeschränkte Produktion von Antikörpern auch gegen heterologe Antigene, verzeichnet (Roberts et al., 1988; Fulton et al., 2003).

Histologisch ist BVDV Antigen bei klinisch kranken wie klinisch gesunden PI Tieren in einer Vielzahl von Zelltypen jeden Organsystems vorzufinden (Liebler-Tenorio, 2005). BVDV-Antigen kann vor allem in epi- und endothelialen Zellen, in der glatten Muskulatur sowie in lymphatischen Zellen detektiert werden, darüberhinaus zeigt es einen deutlichen Neurotropismus. Nachweis von BVDV-Antigen gelang in der Haut (Bielefeldt-Ohmann, 1988a und b; Thür et al., 1996 und 1997; Njaa et al., 2000), in unterschiedlichen Abschnitten des ZNS (Fernandez et al., 1989; Hewicker-Trautwein et al., 1995; Montgomery et al., 2007 und 2008), im Atmungs-, (Bielefeldt-Ohmann, 1988a; Shin und Acland, 2001; Confer et al., 2005), Verdauungs- (Bielefeldt-Ohmann, 1988a und b; Shin und Acland, 2001; Liebler-Tenorio et al., 2004) und Harntrakt (Cutlip et al., 1980; Hewicker et al., 1987; Shin und Acland, 2001), im Knochenmark (Liebler-Tenorio et al., 2004), in lymphatischen Organe (Bielefeldt-Ohmann, 1988a; Shin und Acland, 2001; Liebler-Tenorio et al., 2004) sowie in Nebenniere (Shin und Acland, 2001), Schilddrüse (Larsson et al., 1995; Thür et al., 1997) und im Inselorgan der Bauchspeicheldrüse (Tajima et al., 1992 und 1999; Taniyama et al., 1995 und 1999; Murondoti et al., 1999).

Verschiedene Autoren berichten vom Auftreten eines insulin-abhängigen Diabetes mellitus in PI Tieren (Tajima et al., 1992; Taniyama et al., 1995 und 1999; Murondoti et al., 1999), die wahrscheinlich durch eine immunologisch vermittelte Degradation der B-Zellen der Pankreasinseln bedingt wird (Tajima et al., 1999). Die Infektion des Follikel epithels der Schilddrüse führt möglicherweise zu einer verminderten Ausschüttung der Hormone Trijodthyronin und Thyroxin und ist dadurch eventuell mitverantwortlich für intra- und extrauterine Wachstumsstörungen (Larsson et al., 1995; Stokstad und Løken, 2002). Montgomery et al. (2007 und 2008) vermuten aufgrund der komplexen Interaktion spezifischer ZNS-Strukturen mit Endokrinium und Immunsystem, dass die Infektion des Nervensystems indirekt prä- und postnatales Wachstum, Reproduktion und Immunabwehr beeinflusst.

Mikroskopisch lassen sich bei klinisch gesunden PI Individuen keine oder nur geringgradige Veränderungen feststellen, obgleich gelegentlich auch bei symptomlosen Tieren Immunkomplex-Glomerulonephritiden, Enzephalitiden, hyperkeratotische Alterationen der Epidermis, Akkumulation mononukleärer Zellen in der Glisson' Trias der Leber, mikrofokale Nekrosen des Verdauungstraktepithels und/oder geringgradige morphologische Alterationen lymphatischer Gewebe auftreten können. Vereinzelt treten bei der postmortalen Untersuchung auch milde Retinopathien ohne offensichtlichen Visusverlust zutage (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Die epidemiologische Rolle persistent infizierter Tiere

Obgleich das Ausmaß der Virämie auch in PI-Rindern nicht konstant ist und durch kreuzreagierende, neutralisierende Antikörper sogar vollends sistieren kann (Brock et al., 1998; Grooms et al., 2001), kann BVDV regelmäßig in Epidermis, Speichel- und Tränendrüsen, Respirationsepithelien, Schleimhäuten von Verdauungs- und Urogenitaltrakt und/oder in epithelialen Zellen der Milchdrüsen nachgewiesen werden. Persistent infizierte Tiere können das Virus somit lebenslang und in hohen Dosen mit Hautzellen, Sekreten der Kopfschleimhäute, Fäzes, Urin sowie Milch übertragen und stellen infolgedessen die wichtigste Quelle sowohl für horizontale als auch vertikale Infektionen dar (Thurmond, 2005).

Im Urogenitaltrakt von PI Bullen kann BVDV-Antigen in epithelialen Zellen und Gefäßwänden von Hoden, Nebenhoden und Urethra, aber vor allem in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen nachgewiesen werden (Kirkland et al., 1991; Givens et al., 2003; Grooms, 2004; Borel et al., 2007). Sie scheiden BVDV mit dem Ejakulat aus, was zur horizontalen, transienten Infektion empfänglicher Kühe führt (McClurkin et al., 1979; Barlow et al., 1986; Meyling und Jensen, 1988; Revell et al., 1988; Kirkland et al., 1994; Grooms, 2004). Die Folgen sind reduzierte Konzeptionsraten, Umrindern, embryonaler Fruchttod, Abort oder die Geburt von PI Kälbern (Moennig und Liess, 1995; Grooms, 2004; Brock et al., 2005). Obgleich die Qualität des Spermias von PI Bullen von akzeptabel bis abnormal variiert (McClurkin et al., 1979; Barlow et al., 1986; Revell et al., 1988; Kirkland et al., 1991; Borel et al., 2007) sind die Befruchtungsraten dieser Tiere im Allgemeinen eher gering (Grooms, 2004; Brock et al., 2005). Als atypische, persistierende Infektion wird die lokale Infektion des Hodens bezeichnet, die auf einer transienten Infektion vor der Geschlechtsreife beruht. Bullen können nicht-virämisch, Antikörper-negativ oder -positiv sein und dennoch BVDV in ihren gonadalen Zellen beherbergen, wo das Virus durch die Blut-Hoden-Schranke vor dem Zugriff des Immunsystems geschützt ist. Nur durch die gezielte Untersuchung von Ejakulat kann eine derartige Infektion aufgedeckt werden (Voges et al., 1998; Grooms, 2004).

In PI Kühen vermehrt sich BVDV in epithelialen wie endothelialen Zellen von Ovar, Eileiter und Uterus (Fredriksen et al., 1999) sowie in etwa einem Fünftel der Oozyten (Grooms, 2004). Ovarielle Hypoplasie, gestörte Follikelreifung, hormonelle Imbalanz, reduzierte Fertilität und häufiges Umrindern sind mögliche Folgen (Doll und Moennig, 2002; Grooms, 2004). Wird BVDV nicht mit der Oozyte weitergegeben, kann eine vertikale Transmission mit Implantation der Blastozyste und Ausbildung der Kotyledonen stattfinden (Fredriksen et al., 1999). Ein natürlich entwickelter Nachkomme eines weiblichen PI Tieres wird immer ebenfalls PI sein.

Persistent infizierte Individuen sind jedoch nicht nur durch ihre andauernde Ausscheidung von BVDV ein Risiko für eine Herde; die bestehende Immunsuppression macht sie außerdem empfänglicher für andere infektiöse Erreger und deren Übertragung auf Herdenmitglieder (Liebler-Tenorio et al., 2004). Als „BVD-assoziiert“ werden, auch bei nicht-PI Individuen, vor allem Infektionskrankheiten des Respirations- und Verdauungstraktes sowie eine erhöhte Kälbersterblichkeit beobachtet (Brock et al., 2005; Loneragan et al., 2005; Piccinini et al., 2006).

Eine Mucosal Disease (siehe Kapitel 2.3.5) tritt ausschließlich dann auf, wenn der mit nzp BVDV-infizierte PI Organismus mit einem zp BVDV konfrontiert wird. Noch vor dem Auftreten klinischer Symptome scheiden infizierte Rinder nicht nur nzp sondern auch zp BVDV aus, die bei seronegativen Herdenmitgliedern wiederum zur akuten BVD oder, im Falle des Vorhandenseins weiterer PI Individuen, zur MD führen können (Liebler-Tenorio, 2005).

2.3.5 Mucosal Disease

Experimentelle Induktionen und molekulare Pathogenese

Der Name *Mucosal Disease* geht auf Ramsey und Chivers (1953 und 1957) zurück, die eine mit schweren Erosionen, Ulzerationen und Hämorrhagien des Verdauungstraktes sowie hochgradiger Depletion lymphatischer Organe einhergehende Virusinfektion bei Rindern beschrieben. Gillespie et al. (1961) erkannten zwar, dass der Erreger der MD identisch ist mit dem der von Olafson et al. (1946) beschriebenen BVD, die Pathogenese der Krankheit blieb jedoch noch lange ungeklärt. Auffallend waren zum einen die immunologischen Abnormitäten in MD-kranken Tieren (Thomson und Savan, 1963; Malmquist, 1968; Johnson und Muscoplat, 1973), zum anderen das gehäufte Erkranken nach Impfungen (Peter et al., 1967; McKercher et al., 1968; Rosner, 1968; Bittle und House, 1973). Erst mit der Entdeckung persistierender Infektionen (Coria und McClurkin, 1978) wurde der Zusammenhang zwischen fetaler Infektion, Immuntoleranz, Viruspersistenz und MD erkannt (Steck et al., 1980; Liess et al., 1983 und 1984; Roeder und Drew, 1984). Der Durchbruch bei der Aufklärung der Pathogenese der MD war die Beobachtung, dass aus Fällen von MD immer ein nzp und ein zp Biotyp des BVDV, ein sog. Viruspaar (*virus* oder *matching pair*), isoliert werden konnte. Es entwickelte sich die Hypothese, dass nur mit nzp BVDV PI Tiere nach Superinfektion mit der zp Variante des BVDV an MD erkranken (McClurkin et al., 1984 und 1985). Diese Hypothese wurde durch die ersten experimentellen Induktionen von MD durch Brownlie et al. (1984) und Bolin et al. (1985b) bestätigt. Sie wurde konkretisiert, nachdem die Untersuchung von Viruspaaren aus verschiedenen MD-Fällen zumeist eine enge antigene Verwandtschaft zwischen nzp und zp Biotyp zeigten (Howard et al., 1987; Corapi et al., 1988): MD kann in PI Tieren nach Superinfektion mit zum nzp Biotyp antigenhomologen zp BVDV induziert werden (Brownlie, 1990 und 1991; Moennig et al., 1990; Brownlie und Clarke, 1993; Nakajima et al., 1993). Eine enge antigene Verwandtschaft von nzp und zp BVD-Viren stand jedoch im Gegensatz zu der großen Variabilität der Feldisolate und legte die Vermutung nahe, dass sich das zp Virus aus dem nzp Virus durch Mutation im Einzeltier entwickelt (Brownlie et al., 1984; Howard et al., 1987; Corapi et al., 1988). Genomanalysen verschiedener zp Isolate (Meyers und Thiel, 1996) wie Berichte über das Auftreten von „spontaner“ MD nach *de novo* Synthese von zp BVDV im PI Tier (Ridpath et al., 1991; Gunn und Weavers, 1992; Brownlie und Clarke, 1993; Tautz et al., 1994) bestätigten diese Überlegung. Antigene Ähnlichkeit zwischen nzp und zp BVDV schien im Hinblick auf die spezifische Immuntoleranz eines PI Tieres bedeutend für die Induktion von MD, jedoch nicht allein ausschlaggebend, induzierten doch in anderen Studien auch zum persistierenden, nzp Stamm antigen-heterologe oder „semihomologe“ zp BVDV eine MD (Bolin et al., 1985c; Brownlie et al., 1986; Brownlie, 1991; Brownlie und Clarke, 1993;

Bruschke et al., 1998; Fray et al., 1998; Fritzeimer et al., 1995 und 1997; Loehr et al., 1998; Moennig et al., 1993; Sentsui et al., 2001; Shimizu et al., 1989; Westenbrink et al., 1989). In Anbetracht des variierenden zeitlichen Verlaufs wurden die Termini „early onset“ MD (Frühausbruch oder Frühform) und „late onset“ oder „chronic“ MD (Spätausbruch oder Spätform) eingeführt (Bolin, 1995; Brownlie, 1991; Brownlie und Clarke, 1993), doch erst die Weiterentwicklung und Etablierung molekularbiologischer Methoden in den 1990er Jahren ermöglichten Einblicke in die Mechanismen, die zu den unterschiedlichen Formen der MD führen.

Die „spontane MD“ ist das Resultat zunächst zufälliger Mutationen und Rekombinationen, die im PI Tier zu einem Wechsel des Biotyps von nzp zu zp führen. Untersuchungen durch Desport et al. (1998), Becher et al. (1999) und Fricke et al. (2001) zeigen, dass es im Laufe der Zeit zur Bildung einer Reihe genomisch veränderter RNA-Moleküle im PI-Tier kommt, unter denen auch autonom replizierende zp BVDV schon lange vor Ausbruch einer Erkrankung vorhanden sind. Im Gegensatz zu der endogenen Entstehung MD-induzierender zp BVDV, steht die exogene Superinfektion mit zp BVDV wie sie z.B. bei Impfung, bei MD eines Herdenmitglieds oder bei Einführung mit zp BVDV infizierter Tiere erfolgen kann. Ist das superinfizierende zp BVDV dem persistierenden Virus in seiner Antigenität sehr ähnlich, wird es direkt und unverändert innerhalb von 2-3 Wochen MD induzieren. Im Falle dieser Frühform der MD ist der re-isolierte zp Stamm im Bereich des E2 Strukturproteins dem superinfizierenden identisch (Fritzeimer et al., 1996 und 1997). Weicht das inokulierte zp BVDV in seiner Antigenität vom persistierenden nzp Virus ab, ist der Verlauf der Infektion unbestimmt. Eine enge antigene Verwandtschaft zwischen dem persistierenden und dem superinfizierenden BVDV begünstigt einen Frühausbruch entscheidend, doch spielen weitere Faktoren wie Immunogenität, Replikationseffizienz und Pathogenität des Virus sowie der allgemeine Gesundheitszustand des Tieres und die Funktion seines Immunsystems eine wesentliche Rolle (Bruschke et al., 1998; Loehr et al., 1998; Sentsui et al., 2001). Weist das zp BVDV andere oder zusätzliche neutralisationsrelevante Epitope auf, kommt es zu einem „Wettlauf“ zwischen Immunabwehr und Virusreplikation. Das zp Virus kann nur noch dann MD auslösen, wenn es sein Antigenmuster dem des persistierenden nzp Virus anpasst und sich somit der Immunabwehr entzieht. Dies kann gelingen, wenn durch Rekombination die für die Strukturproteine codierenden Gene des persistierenden nzp BVDV mit den für Nicht-Strukturproteine codierenden Genen des superinfizierenden zp BVDV kombiniert werden. Für die Herausbildung dieser rekombinanten Viruschimäre müssen aber mehrere Bedingungen erfüllt sein: zum einen setzt eine Rekombination voraus, dass das superinfizierende zp Virus bis zu diesem Ereignis im Organismus überdauert, zum anderen dass nzp und zp Virus dieselbe Wirtszelle infiziert haben. Weiterhin muss die zp Rekombinante vermehrungsfähig sein und sich effizient repliziert haben, bevor sie MD-Symptome auszulösen vermag (Fritzeimer, 1996). Bei dem Mechanismus der Rekombination handelt es sich wahrscheinlich um einen Wechsel der RNA-abhängigen RNA-Polymerase von einer Matrize auf eine andere (Fritzeimer, 1996; Becher et al., 1999; Fricke et al., 2001), einem Vorgang der als *Template Switch* oder *Copy-Choice-Mechanismus* für verschiedene tierische und pflanzliche Viren beschrieben ist (Lai, 1992; Coen und Ramig, 1996). Daneben wird aber auch von (Punkt-) Mutationen im Bereich der

Glykoproteingene und RNA-Polymerase-unabhängigen homologen, heterologen sowie intramolukularen Rekombinationen berichtet, die unter dem Selektionsdruck phänotypisch zur Generation eines angepassteren und effizient replizierenden zp BVDV führen (Ridpath und Bolin, 1995; Fritzemeier, 1996; Becher et al., 1999 und 2001; Fricke et al., 2001; Nagai et al., 2003; Gallei et al., 2004; Kameyama et al., 2006).

Klinik

Eine Unterscheidung zwischen Früh- und Spätform der MD ist im Allgemeinen nur unter experimentellen Bedingungen möglich, da in der Mehrzahl der Krankheitsfälle weder der Zeitpunkt der Superinfektion zurückverfolgt noch das superinfizierende zp BVDV charakterisiert werden können. Die Inkubationszeit kann in Abhängigkeit vom pathogenetischen Mechanismus zwischen 2-3 Wochen (Frühausbruch) und mehreren Monaten bis zu Jahren variieren (Spätausbruch) (Liebler-Tenorio, 2005). Das Endstadium der MD ist durch eine mit Tenesmen einhergehende, profuse, wässrige Diarrhoe gekennzeichnet; gelegentlich finden sich Beimengungen von Schleim, Fibrin oder Blut. In etwa 15% der Fälle ist die Kotkonsistenz jedoch normal (Doll und Moennig, 2002). Meist sind als weiteres Hauptsymptom diffuse Rötungen und/oder entzündlich-erosive bis ulzerative Schleimhautveränderungen unterschiedlicher Ausprägung im Bereich der Maulhöhle, hier insbesondere an Gingiva, hartem Gaumen, Zunge, Papillen der Backenschleimhaut und in den Maulwinkeln, am Flotzmaul sowie an den Genitalien zu beobachten. Seltener sind entzündliche Veränderungen an den Naseneingängen und in den Nasenhöhlen. Auch Augen- und Nasenausfluss, Korneaödeme, Hypersalivation, Fehlgärungen und Tympanien können beobachtet werden. Diagnostisch bedeutsam sind ferner lokale oder generalisierte Dermatitis. Häufig finden sich erosiv-nekrotische Veränderungen in den Interdigitalspalten, oder am Kronsaum, die zu ausgeprägter Lahmheit führen können. Auch die Haut im Kopf-/Nackenbereich, an der Schulter und/oder in der Perinealregion, am Präputium und um die Vulva können betroffen sein. Für die bei etwa einem Drittel der MD-kranken Tiere auftretenden Bronchopneumonien, sind in erster Linie bakterielle Sekundärinfektionen verantwortlich. Auch Mastitiden und Metritiden werden beschrieben (Ramsey und Chivers, 1953 und 1957; Voss, 1957; Schulz, 1959; Doll und Moennig, 2002; Evermann und Barrington, 2005). Eine erhöhte Körpertemperatur tritt vornehmlich bei Krankheitsausbruch auf, nach Manifestation klinischer Symptome ist sie nur in etwa einem Drittel der Fälle feststellbar (Doll und Moennig, 2002).

Labordiagnostisch findet sich bei etwa der Hälfte der Tiere eine ausgeprägte Leukozytose, die mit (Doll und Moennig, 2002) oder ohne (Evermann und Barrington, 2005) Kernlinksverschiebung einhergehen kann, nur selten ist eine deutliche Leukopenie zu beobachten. Verschiedene Autoren berichten von Verschiebung zirkulierender Lymphozytensubpopulationen (Bolin et al., 1985a; Larsson et al., 1988; Brusckhe et al., 1998). In Einzelfällen können Hämostasestörungen infolge abnehmender Thrombozytenzahlen auftreten (Abd El-Rahim und Gründer, 1996). Selten wird ein Diabetes mellitus im Zusammenhang mit MD beschrieben (Tajima et al., 1992; Doll und Moennig, 2002).

Nach Auftreten erster klinischer Symptome kann der Verlauf einer MD erheblich variieren; meist sterben die Tiere innerhalb weniger Tage nach rascher Verschlechterung des Allgemeinbefindens, Anorexie und zunehmender Exsikkose (Doll und Moennig, 2002). In seltenen Fällen überleben Rinder eine akute MD, entwickeln aber eine chronische Erkrankung. Diese chronische Verlaufsform der MD ist durch intermittierende Diarrhoe, Kümern, Appetitlosigkeit, rezidivierende Tympanien, erosive Läsionen der Haut, vor allem in den Interdigitalspalten sowie im Kopf-Hals-Bereich, Alopezie und Hyperkeratinisierung gekennzeichnet. Chronische Laminitis und abnormes Wachstum des Klauenhorns können zu dauerhafter Lahmheit führen. Labordiagnostisch finden sich häufig Lymphopenie, Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie (Baker, 1995; Evermann und Barrington, 2005).

Pathologie

Immunhistologische Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass das zp BVDV nicht nur in der molekularen Pathogenese der MD die entscheidende Rolle spielt, sondern auch hauptverantwortlich für die klinischen Manifestationen der Erkrankung ist (Liebler et al., 1991). Für die Verbreitung von zp BVDV nach intranasaler Superinfektion formulierten Liebler-Tenorio et al. (1997) folgendes Muster: nach primärer Ansiedlung und Vermehrung des zp BVDV in den Tonsillen, gelangt das Virus über den Lymphweg in die regionalen Lymphknoten und via *Truncus jugularis* in die Blutbahn. Mit kurzer zeitlicher Verzögerung infiziert zp BVDV Thymus, Milz und periphere Lymphknoten sowie die mukosa-assoziierten, lymphatischen Gewebe NALT und BALT, ist jedoch bevorzugt im GALT sowie in den Mandibular- und Mesenteriallymphknoten nachweisbar. Über den Blutkreislauf gelangt das Virus vornehmlich zellgebunden zum Darm zurück. Ausgehend von den lymphatischen Einrichtungen des Darms, v.a. den Peyerschen Platten des terminalen Dünndarms und der lymphoglandulären Komplexe des proximalen Kolons infiziert zp BVDV zunächst das follikelassoziierte Epithel und breitet sich nachfolgend flächig in der Darmschleimhaut aus.

Entsprechend dem postulierten Ausbreitungsmuster betreffen die klassischen makroskopischen Läsionen einer terminalen MD die Schleimhäute des Verdauungstraktes. In der Maulhöhle, am harten Gaumen, an der Zunge, seltener an den Nasenöffnungen und in der Nasenhöhle finden sich Hämorrhagien oder erosive bis ulzerative und nekrotisierende Entzündungen. Häufig sind längliche Entzündungsherde im Oesophagus sowie Hämorrhagien, Erosionen und Ulzerationen an Pansenpfeilern, in Netz-, Blätter- und Labmagen zu beobachten. Die Darmschleimhaut kennzeichnet eine katarrhalische, erosiv-ulzerative bis fibrinös-nekrotisierende Enteritis, wobei die Regionen der ilealen Peyerschen Platten und der lymphatischen Gewebe des proximalen Kolons am stärksten betroffen sind (Ramsey und Chivers, 1957; Schulz, 1959; Bielefeldt-Ohmann, 1995). Die lymphatischen Organe Thymus und Milz erscheinen meist atrophisch, während periphere Lymphknoten, je nach Krankheitsverlauf, blutigrot, ödematisiert, hyper- oder hypoplastisch sein können (Ramsey und Chivers, 1957; Schulz, 1959; Bielefeldt-Ohmann, 1995). Die Lymphknoten des Verdauungskanal zeigen in der Regel nekrotische Veränderungen, die Lymphfollikel des Darms sind vergrößert oder verkleinert und können oberflächlich nekrotisch und mit Blutgerinnseln oder diphteroid-fibrinösen Massen bedeckt sein. Die oberen Atemwege

zeigen möglicherweise Hyperämien oder leichte katarrhalische Entzündungen, die Lungen eventuell ein interstitielles Emphysem und/oder eine katarrhalische bis eitrig Bronchopneumonie (Ramsey und Chivers, 1957; Schulz, 1959; Bielefeldt-Ohmann, 1995). An der Haut der Innenfläche von Vorder- und Hinterextremität, am Kronsaum, in den Interdigitalspalten, am Perineum, Euter oder Präputium finden sich oft umschriebene Dermatosen in Form von Nekrosen oder Ulzera. Sie führen zu Hyperkeratinisierung und gehen mit Hypotrichose oder Alopezie einher. Sekundäre bakterielle Infektionen provozieren Suppuration (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Mikroskopisch finden sich in Maulhöhle, Oesophagus und Vormägen anfänglich fokale, perivaskuläre entzündliche Infiltrationen und Verdickung der Lamina propria, im Epithel vereinzelte Degenerationen und Nekrosen. In der Phase der terminalen MD werden multifokal Ödematisierung des Stratum spinosum mit ballonierender Degeneration, Kernpyknosen und Nekrosen sowie diffuse Infiltration des Epithels durch Entzündungszellen beobachtet. An der erkrankten äußeren Haut kann die Bildung mehrere Zellschichten umfassende Keratinmassen beobachtet werden, die von Zelltrümmern und Entzündungszellen durchsetzt sind. Schweißdrüsen und Haarfollikel werden in der Regel erst spät im Lauf der Erkrankung betroffen. Auch hier zeigen sich zunächst perifollikuläre und -glanduläre Infiltrationen von Entzündungszellen, die in degenerative bis nekrotisierende Alterationen epithelialer Zellen münden (Ramsey und Chivers, 1957; Schulz, 1959; Bielefeldt-Ohmann, 1995). Die bei terminaler MD makroskopisch erkennbare Atrophie von Tonsillen, Lymphknoten, Thymus und Milz zeigt sich mikroskopisch als hochgradige Depletion der Lymphfollikel (Bielefeldt-Ohmann, 1995), die mit einem kompletten Verlust der zonalen Organisation einhergehen kann (Teichmann et al., 2000). Neben den lymphatischen Organen sind hiervon die mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe NALT, BALT und GALT betroffen (Liebler et al., 1995). Innerhalb eines Lymphfollikels wird zu BVDV nach dem ersten Auftreten in der Korona zunächst im Bereich der äußeren Zone, später diffus im gesamten depletierten Follikel beobachtet. Mit zunehmender Ausbreitung des zu BVDV sinkt die Zahl der B-Lymphozyten, die apoptotischer Zellen steigt und es werden vermehrt allein noch Makrophagen, neutrophile Granulozyten und/oder follikuläre dendritische Zellen gesehen. Erfolgt die Zerstörung der Follikel abrupt, kann es zu einer zystischen Dilatation und zum Einsinken des Darmepithels in die Submukosa kommen (Liebler-Tenorio 2005). Im Darmepithel werden zunächst intraepitheliale Einzelzellnekrosen, Zelldetritusansammlungen, aber auch vermehrt apoptotische Zellen gesehen. Betroffen ist vor allem das follikelassoziierte Epithel im Bereich der Peyerschen Platten und der lymphoglandulären Komplexe des proximalen Kolons. Die gesamte Darmschleimhaut ist diffus von lymphoplasmazellulären Infiltraten durchsetzt. Im weiteren Verlauf kommt es zunächst zu einer zunehmenden Hyperplasie der Schleimhaut mit Abflachung des Epithels. Die Zahl schleimhautassoziiierter Lymphozyten, IgA- und IgM-tragender Plasmazellen ist reduziert (Liebler et al., 1996; Liebler-Tenorio und Pohlenz, 1997), CD4+-T-Lymphozyten dagegen akkumulieren vor allem in Bereichen, in denen sich Schädigungen manifestieren (Liebler-Tenorio, 2005). Späte Veränderungen sind durch diffuse Zottenverkürzung, weitere Epithelabflachung sowie Fragmentierung des Kryptschlauches gekennzeichnet (Liebler-Tenorio und Pohlenz, 1997), bis es in der Endphase durch multifokale Nekrosen zum Verlust

des Schleimhautepithels und zum Zusammenbruch der intestinalen Barriere kommt (Liebler-Tenorio, 2005).

2.3.6 Diagnostik der BVD/MD

Zur Labordiagnose einer BVDV-Infektion steht eine Vielzahl direkter wie indirekter Nachweisverfahren zur Verfügung, deren Einsatz sich an Fragestellung bzw. klinischer Situation orientiert (Wolf, 2008).

Direkte Nachweismethoden

Der direkte Nachweis von BVDV-Antigen in unterschiedlichen Probenmaterialien kann mittels direkter Immunfluoreszenz, immunhistochemischer Methoden, Zytofluorometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter- (FACS) Analyse) oder einem von vielen entwickelten Antigen-Fänger-ELISAs gelingen. Zum direkten Nachweis von Nukleinsäuren stehen verschiedene RT-PCR-Assays zu Verfügung. Die klassische Methode zum Nachweis von BVDV, der sog. „Goldstandard“, ist die Virusanzucht in Zellkultur mit anschließender Identifizierung des Erregers. Zytopathogene BVDV sind anhand ihres zpE zu erkennen, nzp Stämme werden mittels fluoreszierender (direkte Immunfluoreszenz) oder Enzym-markierter mono- oder polyklonaler Antikörper (immunperoxidase monolayer assay, IPMA) oder über einen Antigen-Fänger-ELISA sichtbar gemacht. Beide Biotypen können auch mittels RT-PCR identifiziert werden (Goyal, 2005; Anonymus, 2008).

Indirekte Nachweismethoden

Zum Nachweis von BVDV-Antikörpern kamen ehemals indirekte Immunperoxidase- wie Immunfluoreszenztests zum Einsatz, die jedoch in der Routinediagnostik durch die Entwicklung verschiedenster ELISAs abgelöst wurden. Als „Goldstandard“ der indirekten Nachweiseverfahren gilt der Virusneutralisationstest (Goyal, 2005; Anonymus, 2008).

2.3.7 Kontrolle und Bekämpfung der BVD/MD

Seit Mitte der 1990er Jahre laufen europaweit nationale und regionale Eradikationsprogramme. 2002 wurde durch die Europäische Union das „EU Thematic Network“ gegründet, das sich auf internationaler Ebene mit Epidemiologie, sozio-ökonomischen Aspekten, Diagnostik und biologischer Sicherheit hinsichtlich der BVD/MD beschäftigt. Verschiedene Mitgliedsstaaten der EU wie auch die Organisation für internationale Tiergesundheit (OIE) haben die BVD/MD in die Liste der melde-/anzeigepflichtigen Tierseuchen aufgenommen (Anonymus, 2004).

Allgemein basieren Kontrolle und Bekämpfung der BVD/MD auf drei Elementen: Elimination von PI-Tieren, Verhinderung der (Wieder-) Einschleppung in BVD-freie Herden und systematische Überwachung des Herdenstatus (Anonymus, 2004). Zur Immunprophylaxe stehen verschiedene Impfstoffe und -konzepte zur Verfügung, die kontrovers diskutiert werden (Fulton, 2005; Haas und Moennig, 2008). In Deutschland bestehen seit 1998 freiwillige, auf Leitlinien basierende Bekämpfungsprogramme. Seit 2004 ist die BVD/MD

anzeigepflichtig und wird durch die „Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV-Verordnung)“ vom 11. November 2008 geregelt. Impfungen unterliegen der behördlichen Kontrolle und können sowohl angeordnet als auch verboten werden. Eine amtliche Methodensammlung zur Diagnostik der BVD/MD ist 2008 durch das Friedrich-Löffler-Institut im Bundesanzeiger bekanntgegeben worden.

2.3.8 BVDV bei Schaf, Ziege und Schwein

Ursprünglich wurden Pestiviren nach dem Wirt benannt, aus dem sie isoliert wurden: das BVDV der Rinder, das BDV der Schafe, das CSFV der Schweine. In der Zwischenzeit haben natürliche wie experimentelle Infektionen gezeigt, dass das BVDV wenig speziesspezifisch ist und sich außerhalb des Rindes sowohl in verschiedenen Wirten als auch Zelllinien repliziert (Ames, 2005).

Die Border Disease (BD) der Schafe kann sowohl vom gleichnamigen Pestivirus als auch BVDV-1 und -2 ausgelöst werden (Løken, 1995a; Nettleton et al., 1998; Scherer et al., 2001). Akute postnatale Infektionen beim jungen und adulten Schaf verlaufen meist klinisch inapparent oder verursachen allenfalls milde klinische Symptome in Form von Fieber, Leistungsdepression und Leukopenie. Die Infektion trächtiger Mutterschafe kann zu Fruchtbarkeitsstörungen, Aborten, Totgeburten oder zur Geburt lebensschwacher Lämmer führen. Eine Infektion des Fetus zwischen dem 54. und 65. Tag der Gravidität induziert die Ausbildung einer spezifischen Immuntoleranz. Persistent infizierte Lämmer zeigen den als ‚hairy shaker‘- Syndrom bekannten Symptomenkomplex, der durch geringes Geburtsgewicht, derb-glattes Vlies und zentralnervöse Symptome wie Ataxien, Tremor, steifem Gang oder Veränderungen im Schädelskelett gekennzeichnet ist (Nettleton, 1990; Løken, 1995a; Nettleton et al., 1998). Ein MD-ähnliches Syndrom bei PI Lämmern wurde beobachtet (Jeffrey und Roeder, 1987; Roeder et al., 1987; Nettleton et al., 1992; Orr and Roe, 1993; Monies et al., 2004) und auch experimentell reproduziert (Barlow et al., 1983; Gardiner et al., 1983).

Postnatale BVDV- oder BDV-Infektionen bei Ziegen sind selten und verlaufen wie beim Schaf meist subklinisch. Die Infektion trächtiger Muttertiere resultiert zumeist in Reproduktionsstörungen mit embryonalem Fruchttod, Abort oder Geburt nicht lebensfähigen Nachwuchses. Vor allem in der frühen Phase der Trächtigkeit ist die Letalität für den Fetus groß (Nettleton, 1990; Nettleton et al., 1998; Løken, 1995b). Experimentell gelang die Induktion persistierender Infektionen (Løken und Bjerkås, 1991), ein MD-ähnliches Syndrom wurde bislang nicht beschrieben.

Eine Vielzahl serologischer Untersuchungen beschreibt die natürliche Infektion von Schweinen mit dem BVDV (Løken, 1995b; Ames, 2005). Postnatale Infektionen adulter Schweine mit dem BVDV verlaufen meist subklinisch, obgleich in verschiedenen Untersuchungen Diarrhoe, Fieber und auch respiratorische Symptome dokumentiert wurden (Terpstra und Wensvoort, 1991; Løken, 1995b). Die natürliche und auch experimentell reproduzierte transplazentare Infektion resultierte, ähnlich dem Geschehen in trächtigen Rindern, in Reproduktionsstörungen, Aborten, Totgeburten, Geburt lebensschwacher

und/oder mißgebildeter Ferkel und/oder PI Tieren (Fernelius et al., 1973; Stewart et al., 1980; Terpstra und Wensvoort, 1988; Terpstra und Wensvoort, 1997; Kulcsár et al., 2001; Walz et al., 1999 und 2004). Persistierende Infektionen bei Schweinen gehen mit einer im Vergleich zum Rind deutlicheren klinischen Symptomatik einher; die betroffenen Tiere überleben höchstens einige Monate (Meyers and Thiel, 1996). Die experimentelle Superinfektion eines PI Jungschweins mit zwei, dem persistierenden BVD-Virus in ihrer Antigenität ähnlichen, zu BVDV Stämmen induzierte bis zur Schlachtung des Tieres im 26. Lebensmonat weder eine Serokonversion noch MD-ähnliche Symptome (Terpstra und Wensvoort, 1997).

2.4 BVDV-Infektionen bei Wildwiederkäuern

2.4.1 Serologische Untersuchungen

Antikörper gegen das BVDV bzw. nah verwandte Pestiviren konnten bislang bei ungefähr 50 verschiedenen Arten von Paarhufern der Familien Camelidae, Giraffidae, Bovidae, Antilocapridae, Zervidae, Tragulidae und Suidae festgestellt werden. Aktualisierte Zusammenfassungen und Rezensionen finden sich bei Nettleton (1990), Løken (1995b), Van Campen et al. (2001), Ames (2005) sowie Vilček und Nettleton (2006). Bei Nicht-Paarhufern wurden BVDV-Antikörper bislang bei Bennett-Kängurus (*Macropus rufogriseus*) (Munday 1972) und Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) (Frölich und Streich, 1998) detektiert.

2.4.2 Klinische Hinweise auf „Mucosal Disease“

Zeitnah zur Erstbeschreibung der BVD/MD bei Hausrindern (Olafson et al., 1946; Ramsey und Chivers, 1953 und 1957) erschienen die ersten Berichte zur BVD/MD bei Wildwiederkäuern. Guenther (1954), Shope et al. (1955) sowie Fay und Boyce (1955) berichten von einer „Mucosal Disease“-ähnlichen Tierseuche bei freilebenden Zervidenarten in den USA und auch Richards et al. (1956) diagnostizieren „Mucosal Disease“ bei verschiedenen Maultier- (*Odocoileus hemonius*) und Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*).

Die ersten Berichte über „Mucosal Disease“ in Tierparks und zoologischen Gärten finden sich bei Brass et al. (1966) und Peters (1966). Kast und Kraus (1968), Steger (1973), Schröder und Ippen (1973) sowie Sosnowski (1977) diagnostizieren retrospektiv, anhand pathologisch-anatomischer und -histologischer Befunde „Mucosal Disease“ und auch Schröder (1985) stellt in seiner Zusammenfassung zu Infektionskrankheiten der Zerviden aus dem Zeitraum 1973-1984 bei acht von 624 untersuchten Tieren die Diagnose „Mucosal Disease“. Die Autoren berichten von tödlichen Erkrankungen bei unterschiedlichen Wiederkäuern, unter anderem Dorcasgazellen (*Gazella dorkas*), Heuglinggazellen (*Gazella tilonura*), Grantgazellen (*Gazella granti*), Muntjaks (*Muntiacus muntjak*), Gaur (*Bos gaurus*), Bantengs (*Bos javanicus*), Ducker (*Cephalophus monticola*), Zwergzebus (*Bos taurus indicus*), Davidshirschen (*Elaphurus davidianus*), Yaks (*Bos mutus*), Alpakas (*Lama pacos*),

Lamas (*Lama glama*) und Rentieren (*Rangifer tarandus*). Die betroffenen Tiere hatten klinisch nahezu den gleichen Symptomenkomplex, bestehend aus stark gestörtem Allgemeinbefinden, Apathie, Fressunlust bis Anorexie, therapieresistentem, wässrigem bis blutigem Durchfall, mittelgradigem Fieber, Kopfödemen, Salivation, Konjunktivitis, Augen- und Nasenausfluss, sowie respiratorischen Symptomen gezeigt. Sie verendeten nach ein- bis vierzehntägigem Krankheitsverlauf. Postmortal wurden erosiv-ulzerierende Schleimhautdefekte an Lippen, Zahnfleisch und Zunge, Schleimhautnekrosen im Ösophagus, hämorrhagische bis fibrinöse Enteritis sowie Epitheldefekte am Kronsaum, im Zwischenklauenspalt und an den Afterklauen festgestellt. Steger (1973) berichtet darüber hinaus vom gehäuften Auftreten kongenitaler Missbildungen des Bewegungsapparates und der Augen bei Elenantilopen (*Taurotragus oryx*) sowie einer hohen Rate ungeklärter Aborte bei verschiedenen anderen Wiederkäuern. Vergleichsweise jüngeren Datums sind die Veröffentlichungen von Feinstein et al. (1987) und Rehbinder et al. (1991), die ein „Mucosal Disease“-ähnliches Syndrom bei freilebenden Rehen (*Capreolus capreolus*) und Elchen (*Alces alces*) bzw. ein „BVD/MD“-ähnliches Syndrom bei Elchen beschreiben. Differenzialdiagnostisch wurde in beiden Untersuchungen auch eine BVDV-Infektion in Betracht gezogen, der Virusnachweis verlief jedoch negativ.

Bei allen bislang zitierten Berichten ist festzuhalten, dass der Begriff „Mucosal Disease“ aus heutiger Sicht möglicherweise in einem allgemeiner gefassten Sinn, eine die Schleimhäute betreffende Erkrankung, verwendet wird und nicht in dem nach dem heutigen Wissensstand geltenden Sprachgebrauch. Aufgrund der Vielzahl an Differenzialdiagnosen sind die Diagnosen „Bovine Virusdiarrhoe“ oder „Mucosal Disease“ auf der Grundlage allein klinischer und pathologisch-anatomischer oder -histologischer Befunde nicht möglich. Ohne den Nachweis des Erregers oder eines Viruspaares, kann allein ein Verdacht ausgesprochen werden (Goyal, 2005). Die beschriebenen Fälle sind somit kritisch zu betrachten, es ist aber nicht auszuschließen, dass eine BVDV-Infektion in der Pathogenese eine Rolle gespielt hat und dass es sich in einigen Fällen um MD *sensu stricto* gehandelt haben könnte.

2.4.3 Nachweis von BVD-Virus

Tabelle 1 gibt eine Übersicht zu BVDV- und anderen Pestivirus-Stämmen, die bislang aus exotischen Paarhufern isoliert werden konnten. Ausgewählte Fälle, solche, die Hinweise auf eine *in utero* Infektion als Voraussetzung für eine persistierende Infektion oder die Ausbildung einer MD bergen, werden im Folgenden näher beschrieben.

Eine der ersten Isolierungen von BVDV aus Wildwiederkäuern wird von Romvary (1965) aus Ungarn beschrieben. Nach Beobachtung einer mit Diarrhoe, Nasenausfluss, allgemeiner Schwäche und variierender Ausprägung von Gastroenteritis einhergehenden Tierseuche bei Rehen, gelingt die Anzucht eines nzp BVDV. 1981 berichten Ludwig und McClurkin von der Isolierung ein zp BVDV aus einem Weißwedelhirsch, der unter Ausbildung „Mucosal Disease“-ähnlicher Läsionen erkrankt war. Weber et al. (1982) dokumentieren die Isolierung von BVDV aus Damwild. Eine Schilderung handelt von einem Fall von Fruchttod bei einer gegatterten Damhirschkuh, die nach Koliken und Kreislaufkollaps verendet war. In einem

anderen Fall gelingt der Nachweis in einem von fünf Damhirschkälbern, die in der Entwicklung gestört und im Haarwechsel zurückgeblieben waren und unter gestörter Nahrungsaufnahme und Abmagerung erkrankten. Doyle und Heuschele (1983) berichten von Zwergziegen im Zoo Memphis, aus denen nach gehäuftem Auftreten von Aborten BVDV isoliert werden konnte sowie vom BVDV-Nachweis bei einem an Diarrhoe verendeten Ellipsenwasserbock im San Antonio Zoo. Belknap et al. (2000) verdeutlichen anhand dreier Fälle die differenzialdiagnostische Bedeutung von BVDV-Infektionen bei Lamas. Der erste Fall handelt von einem via *Sectio caesarea* tot entbundenem Kalb, das Hornhauttrübung und leicht ausziehbares Fell zeigte. Aus einem Organpool wurde nzp BVDV-1 isoliert. Die Mutter und weitere 34 Lamas der Herde wurden negativ auf BVD-Virus und -Antikörper getestet. Die postmortale Untersuchung zweier trächtiger, plötzlich verstorbener Tiere einer anderen Farm ergab milde Pneumonie und Lymphadenitis; in einem Pool aus Milz und Nabelschnur konnte BVDV-Antigen nachgewiesen werden. Sechs Monate später wurde ein Neuzugang, ein 15 Monate altes Tier, abgemagert und in Seitenlage aufgefunden; trotz intensiver Behandlung verendete das Tier innerhalb von zwei Wochen. Die Sektion ergab Lymphopenie, Atrophie von Thymus, Milz und Leber sowie veränderte Lymphknoten an Mesenterium und Lungen, aus denen nzp BVDV isoliert werden konnte. Goyal et al. (2002) untersuchten ein tot geborenes Alpakakalb. Während die Sektion keine klaren Befunde erbrachte, wurde aus einem Pool von Lungen-, Leber- und Gehirngewebe nzp BVDV-1b isoliert. Das Muttertier hatte zuvor ein gesundes Kalb geboren und zeigte bis fünf Wochen nach dem Abort keine Hinweise auf eine Serokonversion, so dass keine eindeutigen Rückschlüsse auf einen möglichen Ursprung der Infektion gezogen werden konnten. Aus Großbritannien stammt ein Bericht von Foster et al. (2005), die zunächst eine BVD-Virus- und -Antigen-positive Blutprobe eines unter allgemeiner Schwäche, intermittierender Diarrhoe und Gelenkschwellungen leidenden, sieben Monate alten Alpakas untersuchten. Das Jungtier verendete eine Woche nach Blutentnahme. Postmortal wurde pestivirales Antigen in Leber, Nieren und Lungengewebe detektiert und aus Lebergewebe und Plasma ein nzp BVDV-1 isoliert. Ob es sich um ein persistent oder transient infiziertes Tier gehandelt hat, konnte nicht sicher beurteilt werden. Nachfolgend wurden 15 weitere Alpakas sowie fünf Rinder der Farm getestet. Allein ein weiteres Alpaka-Jungtier stellte sich als transient infiziert heraus, die fünf Rinder besaßen BVDV-Antikörper. Pizarro-Lucero et al. veröffentlichten 2005 die Isolierung eines nzp BVDV aus einem im südlichen Chile tot aufgefundenen Pudu. In der Sektion zeigten sich erosive Läsionen an äußerer Haut, Maulschleimhaut, Zwischenklauenspalt und Ösophagus, eine Serumprobe reagierte positiv auf BVDV-Antikörper und aus einem Ösophagus-Homogenat konnte nzp BVDV isoliert werden. Welche Rolle das Isolat „Pudu-CH“ im Krankheitsverlauf gespielt hat, blieb unbekannt, eine persistierende Infektion schlossen die Autoren aufgrund des Vorhandenseins von BVDV-Antikörpern aus. Deregt et al. (2005) berichten von BVDV-Infektionen bei Bisons. Der Besitzer einer kommerziell genutzten Herde beklagte den Verlust eines Drittels der Nachzucht, mehrere Kälber hatten hochgradige Lahmheit, Enteritis, Apathie und Anorexie gezeigt, aus einem Bisonkalb konnte ein nzp BVDV-1a isoliert werden, sowie eine Häufung MD-ähnlicher Todesfälle unter Alttieren. Ein weiterer Bericht schildert die Isolierung von nzp BVDV-1b aus einem adulten Bisonbullen, der ohne vorausgehende klinische Symptome

plötzlich verendet war. Vorberichtlich hatte die in einem Nationalpark ansässige Herde mehrere Fälle von allgemeiner Schwäche und Diarrhoe erfahren.

Im Rahmen einer epidemiologischen Studie isolierten Proganichniy et al. (2008) zwei BVDV-Stämme aus Lymphknoten und Hautbiopsaten erlegter Weißwedelhirsche in Indiana. Ob es sich bei den betroffenen Tieren um eine transiente oder eine persistierende Infektion handelte, konnte nicht bestimmt werden. Dagegen nahmen Passler et al. (2008) aufgrund des Verteilungsmusters von BVDV-Antigen in der Hautprobe eines freilebenden Weißwedelhirschs in Alabama eher eine persistierende als eine transiente Infektion des betroffenen Tieres an. Chase et al. (2008) gelang bei zwei Weißwedelhirschen in South Dakota sowohl der immunhistochemische Nachweis von BVDV-Antigen in Ohrstanzproben als auch die Isolierung von BVDV. Eine persistierende Infektion wurde vermutet.

Ebenso wurde bei Wasserbüffeln einer Milchfarm in Argentinien der Verdacht auf eine persistierende Infektion geäußert (Craig et al., 2008). Die Tiere hatten Fieber, Anorexie, Hämaturie oder Hämoglobinurie sowie Enteritis gezeigt und waren innerhalb weniger Tage verendet. Die histologische Untersuchung ergab unter anderem eine Glomerulopathie sowie suppurative Enteritis. Via Immunhistochemie konnte BVDV-Antigen in epithelialen Zellen der Gallenblase, der Lieberkühn' Krypten sowie in den kortikalen Nierentubuli nachgewiesen und aus Milz-, Nieren- und Ileumproben BVDV-1a und -1b isoliert werden. Martucciello et al. (2009) halten rückblickend eine BVDV-Infektion als Ursache für das gehäufte Abortgeschehen bei Wasserbüffeln zweier milchproduzierender Betriebe in Italien für wahrscheinlich. Zur Untersuchung waren drei abortierte Feten sowie Blutproben der jeweiligen Muttertiere gelangt. Nach Ausschluss anderer mikrobieller Aborterreger konnte aus allen drei Feten nzp BVDV-1b isoliert werden. Während sich in den nachfolgenden Untersuchungen zwei der Muttertiere als transient infiziert herausgestellt hatten, wurde bei dem dritten Muttertier der Verdacht einer persistierenden Infektion ausgesprochen.

Tab. 1: Übersicht zu Isolaten von Bovinem Virusdiarrhoe Virus (BVDV) und anderen Pestiviren exotischer Paarhufer; nzp: nicht-zytopathogen, zp: zytopathogen, Ziffer und Letter bezeichnen die BVDV-Spezies bzw. den jeweiligen Subtyp

| Tierart | BVDV | Quelle |
|--|----------------------------|---|
| Stirnwaffenträger (<i>Pecora</i>) | | |
| Elenantilopen (<i>Taurotragus oryx</i>) | nzp BVDV-1a | Anderson und Rowe (1998), Vilcek et al. (2000) |
| Nilgauantilope (<i>Boselaphus tragocamelus</i>) | nzp BVDV | Doyle und Heuschele (1983) |
| Bongo (<i>Tragelaphus eurycerus</i>) | BVDV-1b | Becher et al. (1997 und 1999) |
| Bison (<i>Bison bison</i>) | nzp BVDV-1a nzp BVDV-1b | Deregt et al. (2005) |

LITERATURÜBERSICHT

Fortsetzung Tab. 1:

| Tierart | BVDV | Quelle |
|---|-------------|---------------------------------------|
| Yak (<i>Bos poepagus grunniens</i>) | nzp BVDV | Mishra et al. (2008) |
| Wasserbüffel (<i>Bubalus bubalis</i>) | BVDV-Ag | Craig et al. (2008) |
| | nzp BVDV-1b | Martucciello et al. (2009) |
| Afrikanischer Büffel (<i>Syncerus caffer</i>) | BVDV-1 | Becher et al. (1997 und 1999) |
| Weißschwanzgnu (<i>Connochaetes gnou</i>) | nzp BVDV | Doyle und Heuschele (1983) |
| Ellipsenwasserbock (<i>Kobus ellipsiprymnus</i>) | BVDV | Doyle und Heuschele (1983) |
| Zwergziege (<i>Capra hircus</i>) | BVDV | Doyle und Heuschele (1983) |
| Japanischer Serau (<i>Capricornis crispus</i>) | BVDV-1c | Harasawa et al. (2006) |
| Schneegämse (<i>Oreamnus americanus</i>) | BVDV-2 | Nelson et al. (2008) |
| Gazellenart (<i>Gazella spp</i>) | BVDV | Evermann et al. (1993) |
| Reh (<i>Capreolus capreolus</i>) | nzp BVDV | Romvary (1965) |
| | BVDV | Schellner (1977) |
| | zp BVDV-1c | Frölich (1995), Fischer et al. (1998) |
| Maultierhirsch (<i>Odocoileus hemonius</i>) | nzp BVDV-1a | Van Campen et al. (2001) |
| Weißwedelhirsch (<i>Odocoileus virginianus</i>) | zp BVDV | Ludwig und McClurkin (1981) |
| | BVDV-1b | Ridpath et al. (2006) |
| | BVDV- 2 | |
| | nzp BVDV-1a | Proganichniy et al. (2008) |
| | zp BVDV-1b | |
| | BVDV-Ag | Passler et al. (2008) |
| | BVDV-1b | Chase et al. (2008) |
| | BVDV-2a | |

LITERATURÜBERSICHT

Fortsetzung Tab. 1:

| Tierart | BVDV | Quelle |
|--|-------------|------------------------------|
| Pudu (<i>Pudu puda</i>) | nzp BVDV-1b | Pizarro-Lucero et al. (2005) |
| Damhirsch (<i>Dama dama</i>) | BVDV | Neumann et al. (1980) |
| | BVDV | Weber et al. (1982) |
| | nzp BVDV | Diaz et al. (1988) |
| Rothirsch (<i>Cervus elaphus</i>) | nzp BVDV | Nettleton et al. (1980) |
| Axishirsch (<i>Axis axis</i>) | nzp BVDV | Doyle und Heuschele (1983) |
| Barasingha (<i>Cervus duvaucelii</i>) | nzp BVDV | Doyle und Heuschele (1983) |
| Hirschferkel (<i>Tragulidae</i>) | | |
| Kleinkantschil (<i>Tragulus javanicus spp.</i>) | nzp BVDV-1f | Grøndahl et al. (2003a) |
| Schwielensohler (<i>Tylopoda</i>) | | |
| Dromedar (<i>Camelus dromedarius</i>) | zp BVDV-2 | Yousif et al. (1998) |
| Lama (<i>Lama glama</i>) | BVDV | Evermann et al. (1993) |
| | nzp BVDV | Belknap et al. (2000) |
| Alpaka (<i>Lama pacos</i>) | nzp BVDV-1b | Goyal et al. (2002) |
| | nzp BVDV-1 | Foster et al. (2005) |
| | nzp BVDV-1b | Carman et al. (2005) |
| | BVDV-1 | Mattson et al. (2006) |
| | nzp BVDV-1b | Foster et al. (2007) |
| | nzp BVDV-1b | Byers et al. (2009) |

LITERATURÜBERSICHT

Fortsetzung Tab. 1:

| Tierart | Pestivirus | Quelle |
|--|--------------------|--|
| Giraffe (<i>Giraffa camelopardalis</i>) | eigener Genotyp | Plowright (1969), Becher et al. (1997, 1999 und 2003), Harasawa et al. (2000), Avalos-Ramirez et al. (2001), Vilček und Nettleton (2006) |
| Rentier (<i>Rangifer tarandus</i>) | BDV-2 | Avalos-Ramirez et al. (2001), Becher et al. (1999 und 2003), Vilček und Nettleton (2006) |
| Wisent (<i>Bison bonasus</i>) | BDV-2 | Becher et al. (1999 und 2003), Vilček und Nettleton (2006) |
| Pyrenäen-Gämse (<i>Rupicapra pyrenaica pyrenaica</i>) | BDV | Arnal et al. (2004), Hurtado et al. (2004), Frölich et al. (2005) |
| Gabelantilope (<i>Antilocapra americana</i>) | eigener Genotyp | Vilček et al. (2005b), Vilček und Nettleton (2006) |
| Wildschwein (<i>Sus scrofa</i>) | CSFV 2 | Vilček und Nettleton (2006) |

2.4.4 Persistierende Infektionen bei Wildwiederkäuern

Bis 2003 konnten bei zwei Arten von Wildwiederkäuern persistierende Infektionen mit dem BVDV diagnostiziert werden. Der erste Nachweis erfolgte bei einer freilebenden Elenantilope (*Taurotragus oryx*) in Zimbabwe (Anderson und Rowe, 1998; Vilcek et al., 2000), der zweite bei einer Population in Gefangenschaft gehaltener Kleinkantschile (*Tragulus javanicus*) in den Niederlanden (Grøndahl et al., 2003a und b; Hoyer et al., 2003, 2005; Uttenthal et al., 2006). Seither sind persistierende Infektionen auch bei Alpakas (*Lama pacos*) (Carman et al., 2005; Mattson et al., 2006, Foster et al., 2007; Byers et al., 2009) und Schneegämsen (*Oreamnos americanus*) (Nelson et al., 2008) nachgewiesen worden. Das Vorliegen einer persistierenden Infektion bei Wasserbüffeln (*Bubalus bubalis*) wurde vermutet (Craig et al., 2008; Martucciello et al., 2009) (siehe Kapitel 2.4.3). Experimentell gelang die Induktion einer persistierenden Infektion bei Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) (Passler et al., 2007; Duncan et al., 2008) (siehe Kapitel 2.4.5). Ein bestätigter Nachweis von MD bei einem exotischen Wiederkäuer findet sich bislang nicht in der Literatur.

2.4.4.1 Persistierende Infektion bei Elenantilopen

Im Rahmen einer großangelegten Studie wurden zwischen 1989 und 1995 im süd-östlichen Zimbabwe zahlreiche Blutproben von freilebenden Elenantilopen (*Taurotragus oryx*) gesammelt und direkt wie indirekt auf verschiedene Pathogene untersucht (Anderson und Rowe, 1998; Vilcek et al., 2000). Von 1539 Proben erwiesen sich 32% als positiv für BVD-Antikörper. Negative Proben wurden mit Hilfe eines Antigen-Capture-ELISA untersucht und von den positiv befundeten anschliessend Virus in Zellkultur isoliert. In drei, zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme klinisch unauffälligen Tieren, wurde nzp BVDV detektiert. Während sich zwei der drei Tiere bei folgenden Untersuchungen als BVD-Virus-negativ herausstellten und eines der beiden serokonvertierte, wurde das dritte Tier als PI diagnostiziert. Der Allgemeinzustand dieser juvenilen Elenkuh verschlechterte sich nachfolgend zunehmend, das Tier entwickelte eine fieberhafte Erkrankung und starb. Ob dieser Verlauf im Zusammenhang mit der BVDV-Infektion stand, konnte nicht festgestellt werden.

2.4.4.2 Persistierende Infektionen bei Kleinkantschilen

Die Diagnose persistierender Infektion und darüber hinaus vertikaler Übertragung von BVDV bei exotischen Wiederkäuern gelang das erste Mal bei in Gefangenschaft gehaltenen Kleinkantschilen (*Tragulus javanicus*)¹ (Grøndahl et al., 2003; Hoyer et al., 2003, 2005) Im Rahmen des Europäischen Erhaltungszuchtprogrammes (EEP) wurde im August 2002 ein Kleinkantschil aus der Population des Artis Royal Zoos, Amsterdam, zu Zuchtzwecken in den Kopenhagener Zoo verbracht. Das in Dänemark laufende Programm zur Eradikation der BVD/MD verpflichtete den Kopenhagener Zoo, Serumproben des importierten Wiederkäuers während der Quarantäne auf BVD-Virus und -Antikörper zu testen. Der männliche Kleinkantschil mit der Zuchtbuchnummer 0109 (Abb. 6) erwies sich zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten, an den Tagen 1, 19 und 40, als mit nzp BVDV infiziert und frei von BVDV-Antikörpern. Nachfolgend wurden im Amsterdamer Zoo Serumproben von Mutter- (9812), Vater- (9733) sowie einem weiblichen Geschwistertier (0205) auf BVD-Virus und BVDV-Antikörper getestet. Mutter- und Geschwistertier zeigten sich ebenfalls Virus-positiv und Antikörper-negativ, wohingegen der Vater Virus-negativ war, aber hohe Titer neutralisierender Antikörper gegen das isolierte Virus trug. In Anlehnung an die Epidemiologie der BVD/MD bei Hausrindern, wurden Muttertier und beide Nachkommen als PI diagnostiziert (Abb. 6). Da die Virusisolate von Muttertier 9812 und männlichem Nachkommen 0109 sowohl im Bereich der 5'UTR als auch im Bereich der E2-kodierenden Region identisch waren, wurde über die Diagnose einer persistierenden Infektion hinaus die Mutter als Quelle der Infektion der beiden Nachkommen angenommen und die Hypothese einer vertikalen Übertragung des Virus durch *in utero* Infektion aufgestellt (Grøndahl et al., 2003a, Uttenthal et al., 2006). Auf dieser Grundlage wurden einmalig Plasma- und Serumproben aller Kleinkantschile, die zu dieser Zeit im Bestand des Artis Zoos lebten auf BVD-Virus und BVDV-Antikörper getestet. Das jeweilige Tier wurde als PI angenommen, sofern BVDV isoliert werden konnte, es Antikörper-negativ und ein

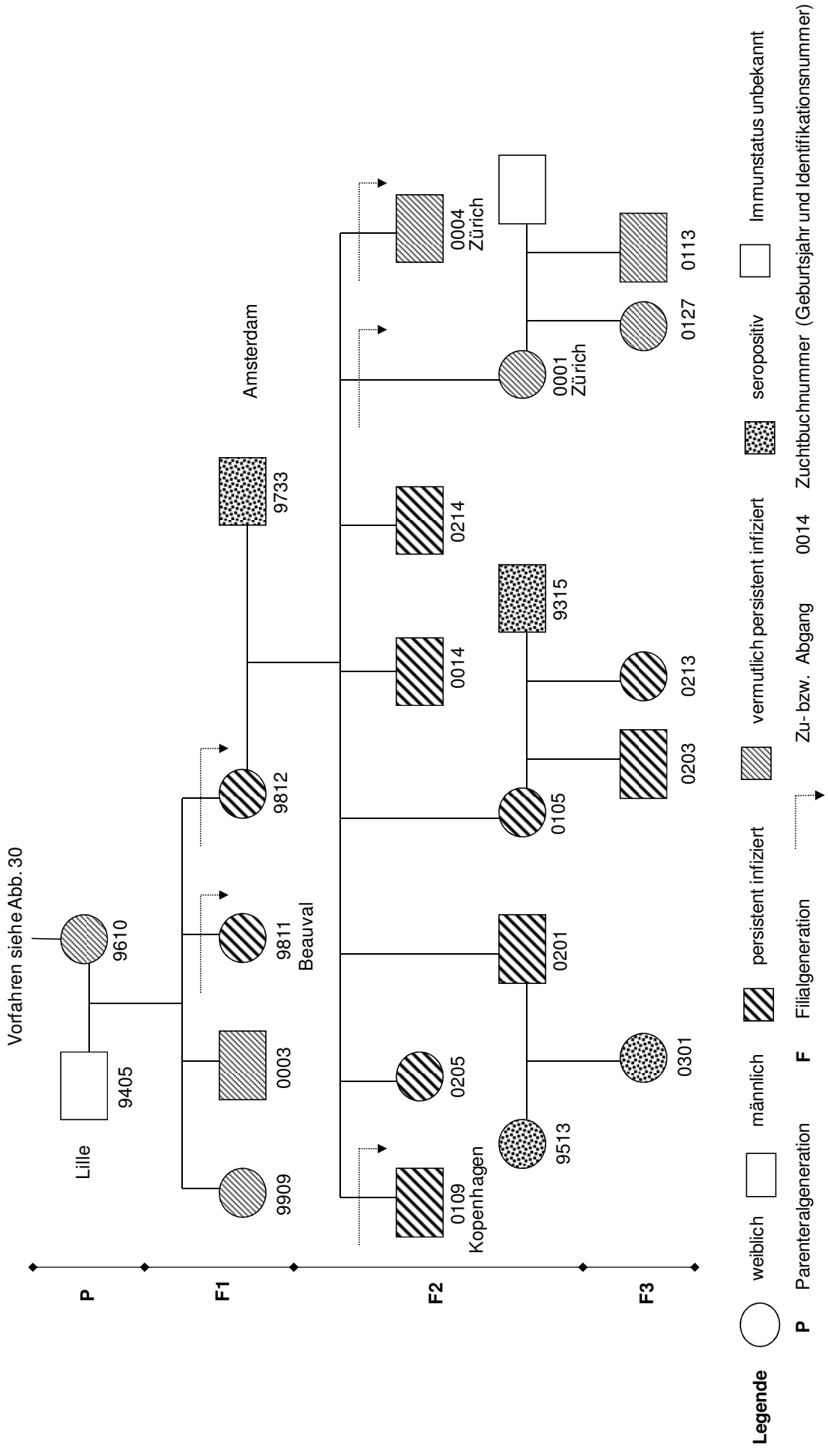
¹ zur Artzuordnung siehe Kapitel 3.1 und 2.1.1

Nachkomme des PI diagnostizierten Muttertieres war. Es zeigte sich, daß von elf (5.6) zu dieser Zeit im Bestand gehaltenen Kleinkantschilen, acht (4.4) PI waren, während die drei übrigen Tiere, die zu Zuchtzwecken in die Amsterdamer Gruppe eingeführt worden waren, Virus-negativ, aber Antikörper-positiv waren (Abb. 6). Möglicherweise hatte erst der Kontakt zu den PI Tieren diese Serokonversion induziert (Hoyer et al., 2003, 2005; Uttenthal et al., 2006). Es stellte sich eine vertikale Übertragung des Virus über drei Generationen heraus, die durch Sequenzanalyse und Vergleich der isolierten Viren von Muttertier 9812 in der F1-Generation, den Nachkommen 0109, 0205 sowie 0105 in der F2-Generation und 0213 in der F3-Generation bestätigt werden konnte. Die Parenteralgeneration (9405 und 9610) des Muttertieres 9812 im Parc Zoologique de Lille war zum Zeitpunkt der Untersuchung schon verstorben, aber das ältere, weibliche Geschwistertier 9811 im Zooparc de Beauval wurde ebenfalls PI diagnostiziert (Abb. 6). Da ein Muttertier, das aufgrund einer transienten BVDV Infektion einen PI Nachkommen zur Welt bringt, später keinen weiteren PI Nachkommen haben würde, wurde der Verdacht einer persistierenden Infektion bei dem Muttertier 9610 in der Parenteralgeneration ausgesprochen (Uttenthal et al., 2006). Folglich wurden auch die bereits gestorbenen Individuen 9909 und 0003 in der F1-Generation als PI angenommen (persönliche Mitteilung M. J. Hoyer, 2004) (Abb. 6). Die vertikale Fortsetzung der persistierenden Infektion hätte sich in diesem Fall nicht über drei, sondern über vier Generationen erstreckt.

2.4.4.3 Persistierende Infektionen bei Schneegämsen

Ende 2004 wurde eine Gruppe von vier Schneegämsen (*Oreamnus americanus*) in einen zoologischen Garten in Idaho eingeführt (Nelson et al., 2008), darunter ein 7-Monate alter Bock mit auffällig gestörtem Wachstum, der wenige Wochen später tot aufgefunden wurde. Postmortal gelangen Antigennachweis und Isolierung eines BVDV-2. Von den Kontakttieren erwiesen sich zwei weitere Schneegämsen, zwei Weißwedelhirsche und ein Maultierhirsch als Antikörper-positiv, aus der vierten, Antikörper-negativen Schneegämse konnte ebenfalls ein BVDV-2 isoliert werden. Dieses Tier wurde wenige Wochen später tot aufgefunden. Während im Fall des jungen Bocks nicht zwischen einer transienten oder einer persistierenden Infektion unterschieden werden konnte, konnte eine persistierende Infektion im zweiten Fall bestätigt werden. Als Todesursache vermuten die Autoren anhand der Sektionsbefunde in beiden Fällen bakterielle Sekundärinfektionen.

Abb. 6: Ausschnitt aus dem Stammbaum der Kleinkantschile des Artis Royal Zoos, Amsterdam, mit Kennzeichnung des Infektionsstatus sowie dem Aufenthaltsort der einzelnen Individuen (Stand 2004; Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. J. Hoyer)



2.4.4.4 Persistierende Infektionen bei Alpakas

Carman et al. (2005) schildern die horizontale und vertikale Übertragung einer BVDV-Infektion innerhalb einer kommerziell genutzten Alpakaherde (*Lama pacos*) in Kanada. Als Ausgangspunkt der Infektion wird die Einführung eines Muttertier-Jungtier-Paares vermutet. Das drei Monate alte Kalb war in schlechtem Allgemeinzustand und zeigte intermittierende Diarrhoe, Pneumonie und Nasenausfluss. Trotz intensiver Therapie verendete es im Alter von acht Monaten. Nach Einführung des Paares fielen bei neun adulten Tieren unspezifische Symptome wie Lethargie und Anorexie auf, vier Tiere abortierten. Aus einer Hautprobe eines der abortierten Feten wurde ein nzp BVDV-1b isoliert. Alle adulten Tiere und zwei Jungtiere wurden positiv auf BVDV-Antikörper und negativ auf BVDV-Antigen getestet. Allein ein weibliches Tier, das die Farm vor Ankunft des Mutter-Jungtier-Paares verlassen hatte, zeigte sich Antikörper-negativ. Sämtliche nach dem ersten Abortfall geborenen Kälber wurden unmittelbar nach ihrer Geburt auf das Vorliegen einer BVDV-Infektion getestet. Positiv verlief diese Untersuchung bei einem männlichen Kalb mit unterdurchschnittlichem Geburtsgewicht, das zudem chronische Diarrhoe, Episoden übermäßigen Augenausflusses sowie schütteres Vlies zeigte. Es erwies sich als PI, wurde am 46. Lebenstag euthanasiert und ein nzp BVDV-1b isoliert.

Ein weiterer Fallbericht stammt von einer Alpakafarm in Pennsylvania (Mattson et al., 2006). Ein weibliches Jungtier, eine Frühgeburt mit unterdurchschnittlichem Geburtsgewicht, fiel im Alter von ca. 10 Wochen durch geringes Wachstum, mukopurulenten Nasenausfluss und Pyrexie auf. Die Erkrankung erwies sich als weitestgehend therapieresistent und der Allgemeinzustand des Tieres verschlechterte sich zunehmend. Durch wiederholten Nachweis von BVDV-1 wurde es als PI diagnostiziert und euthanasiert. Drei Wochen später wurde ein weiteres Kalb geboren, dessen Muttertier während der Trächtigkeit ständigen Kontakt zu dem PI Jungtier gehabt hatte. Das zweite Kalb erschien bei der Geburt klinisch gesund, nahm aber nur wenig an Gewicht zu. Im Alter von sechs Wochen wurde es als BVDV-positiv sowie Antikörper-negativ diagnostiziert und unter dem Verdacht einer persistierenden Infektion euthanasiert.

Foster et al. (2007) schildern vier Fälle von BVDV-Infektionen auf einer Alpakafarm in Großbritannien. Im Februar 2005 zeigte ein sieben Monate altes Alpaka einen zunehmend schlechten Allgemeinzustand, litt unter intermittierender Diarrhoe und Gelenkschwellungen und verstarb schließlich. Aufgrund des Vorberichts, des Nachweises von BVDV-Antigen sowie der Isolierung von nzp BVDV-1b wurde eine persistierende Infektion vermutet. Wenige Monate später verendeten zwei weitere kümmernde Tiere; ein zweijähriges Jungtier sowie ein zwei Monate altes Alpaka-Kalb. Via Immunhistochemie konnte in beiden Fällen eine intensive Anreicherung von BVDV-Antigen in Haut und Gehirn nachgewiesen sowie BVDV-1b aus verschiedenen Organen isoliert werden. Beide Individuen wurden als PI diagnostiziert. Die postmortale Untersuchung eines im sechsten Trächtighkeitsmonat abortierten Fetus verlief befundlos, jedoch wurde BVDV-1b in der Milz des Fetus sowie in der Plazenta detektiert. Das Muttertier zeigte sich Ak-positiv und Virus- wie Antigen-negativ. In einer Screeninguntersuchung der übrigen Alpakas zeigten sich mehrere klinisch gesunde Tiere Antikörper-positiv, darunter auch die Mütter der verendeten Jungtiere, ein Jungtier wurde als

transient infiziert diagnostiziert. Aufgrund vieler Tierbewegungen der expandierenden Farm nehmen die Autoren eine Einschleppung des Erregers an, die Quelle der BVDV-Infektionen konnte jedoch nicht zurückverfolgt werden. Während in den Fällen der verendeten Jungtiere eine persistente oder transiente BVDV-Infektion des Vatertieres vermutet wird, scheint den Autoren im Fall des abortierten Fetus eine transiente Infektion des Muttertieres wahrscheinlich.

Der jüngste dokumentierte Fall von persistierender Infektion bei Alpakas findet sich bei Byers et al. (2009). Die Autoren berichten von der postmortalen Untersuchung eines männlichen Jungtieres, das durch Kümern, Anorexie sowie Infektion des oberen Respirationstraktes aufgefallen und durch wiederholten Nachweis von BVDV-1 als PI diagnostiziert wurde. Das Blutbild zeigte eine leichte Linksverschiebung, Anämie, niedrige Hämoglobinwerte sowie eine deutliche Anisozytose. Die Sektion ergab eine akute, suppurative Bronchopneumonie, ulzerative Gastritis, multifokale entzündliche Infiltration der Darmschleimhaut und reduzierte Lymphozytenzahlen in Follikeln lymphatischer Gewebe. Mittels Immunhistochemie wurden große Mengen BVDV-Antigens in Zellen des Verdauungs-, Atmungs- und Urogenitaltraktes sowie in den lymphatischen Organen detektiert und ein BVDV-1b isoliert.

2.4.5 Experimentelle Infektionen von Wildwiederkäuern mit BVDV

Richards et al. (1956) infizierten eine Antilope (*Antilocapra americana*) mit einem Blut-Milz-Homogenat eines an „Mucosal Disease“ erkrankten Maultierhirschs (*Odocoileus hemionus*) sowie gesunde Weisswedelhirsche (*Odocoileus virginianus*) mit Materialien erkrankter Weisswedelhirsche und mit einem Milzhomogenat eines erkrankten Stieres. Indirekt, durch Haltung in einem kontaminierten Stall, erfolgte die Infektion eines Maultierhirschs. In allen Fällen wurden schwere Krankheitsverläufe beobachtet, die jedoch Karstad (1981) zufolge möglicherweise auf andere Ursachen als eine BVDV-Infektion zurückzuführen sind. McMartin et al. (1977) infizierten drei Rothirsche (*Cervus elaphus*) mit Material eines an „Mucosal Disease“ verendeten Rindes. Keines der Tiere zeigte klinische Symptome, zwei serokonvertierten. Die durch Ludwig und McClurkin (1981) vorgenommene, experimentelle Infektion trächtiger Hirschkühe resultierte in mummifizierten Feten, Totgeburten, aber auch lebend geborenen Kälbern. Milde Symptome sollen zwei experimentell mit BVDV infizierte Rentiere (*Rangifer tarandus*) (Morton et al., 1990) sowie Wasserbüffelkälber (*Bubalus bubalis*) (Hegazy et al., 1991) gezeigt haben. Van Campen et al. (1997) infizierten vier Maultierhirsche und einen Weißwedelhirsch mit einem bovinen BVDV-Stamm. Keines der Tiere zeigte klinische Symptome, Virus konnte bis eine Woche *p.i.* in Nasentupfern und bis zwei Wochen *p.i.* in Leukozyten nachgewiesen werden. Die ungefähr drei Monate *p.i.* stattfindende postmortale Untersuchung erbrachte nur unspezifische Veränderungen und es wurde aus keinem der beprobten Organe Virus isoliert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Tessaro et al. (1999) nach Inokulation von Rothirschen mit einem zp BVDV-1 und einem nzp BVDV-2. Keiner der experimentell infizierten Rothirsche erkrankte, alle hatten bis 14 Tage *p.i.* hohe Titer neutralisierender Antikörper entwickelt. Die Autoren schlossen daraus, dass Hirsche zwar empfänglich für BVDV sind, das Virus ausscheiden und zeitlich begrenzt übertragen können, dass aber eine akute BVDV-Infektion bei nichttragenden Tieren dieser

Spezies keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Van Campen et al., 1997; Tessaro et al., 1999).

Wentz et al. präsentierten 2003 ihre Ergebnisse einer experimentellen Infektion trächtiger Lamas (*Lama glama*). Vier Tiere wurden am 67., 68. bzw. 102. Tag der Trächtigkeit mit einem aus einem abortierten Fetus isolierten nzp BVDV-Stamm (Belknap et al., 2000) inokuliert. Keines der trächtigen Tiere zeigte klinische Symptome, im Verlauf eines Monats hatten alle serokonvertiert. Das am 68. Tag infizierte Muttertier abortierte fünf Monate nach Inokulation, die drei übrigen gebaren gesunde und Virus- wie Antikörper-negative Kälber. Zwei der drei Kälber starben im Laufe des ersten Lebensjahres unter akuten neurologischen Symptomen; ein Zusammenhang mit einer BVDV-Infektion konnte nicht festgestellt werden.

Der klinische Verlauf einer akuten BVDV-Infektion bei Cerviden war Studienobjekt von Ridpath et al. (2007). Acht handaufgezogene Weißwedelhirschkälber wurden mit einem BVDV-1b oder BVDV-2 inokuliert; beide Isolate stammten von Weißwedelhirschen. Die Inokulation führte innerhalb weniger Tage zu einer deutlichen Abnahme zirkulierender Lymphozyten und erhöhter Körpertemperatur. Einzelne Tiere fielen durch temporäre Lethargie, steifen Gang oder Husten auf. Im gleichen Zeitraum konnten die inokulierten BVDV-Stämme aus weißen Blutzellen der infizierten Tiere reisoliert werden. Am 21. Tag *p.i.* hatten drei von vier mit BVDV-1b und zwei von vier mit BVDV-2 inokulierten Weißwedelhirsche serokonvertiert.

Passler et al. (2007) gelang erstmalig die experimentelle Induktion einer persistierenden Infektion bei Weißwedelhirschen. Nach Inokulation von neun trächtigen Weißwedelhirschkühen, entwickelte eine Kuh ein klinisch gesundes, aber PI Kalb. Eine detaillierte histologische und immunhistochemische Untersuchung von zwei experimentell PI Weißwedelhirschkälbern findet sich bei Duncan et al. (2008). Die persistierende Infektion wurde durch Inokulation des Muttertieres in der 6.-7. Woche der Trächtigkeit mit einem BVDV-2 induziert und die zwei Jungtiere unmittelbar nach ihrer Geburt positiv auf das inokulierte Virus und negativ auf BVDV-Antikörper getestet. Beide Kälber wurden während der ersten Nacht von der Kuh getötet. Das histologische Bild sowie die Verteilung von BVDV-Antigen entsprachen den Autoren zufolge weitestgehend dem von PI Rindern.

3. Material und Methoden

3.1 Das Versuchstier

Bei dem Versuchstier handelte es sich um einen männlichen, klinisch gesunden Kleinkantschil aus der Gruppe des Artis Royal Zoos, Amsterdam² (Zb.Nr. 0014) (siehe Kap. 2.4.4.2 und Abb. 6). In Anlehnung an die Immunpathogenese der BVD/MD bei Hausrindern waren acht von elf im Bestand des Artis Zoos gehaltenen Kleinkantschilen als persistent mit nzp BVDV infiziert diagnostiziert worden (Hoyer et al., 2003 und 2005). Sechs dieser acht PI Kleinkantschile wurden unmittelbar nach Feststellung der BVDV-Infektion vom verantwortlichen Tierarzt euthanasiert und allein zwei Individuen (Zb. Nr. 0014 und 0214) zu wissenschaftlichen Zwecken am Leben erhalten (Hoyer et al., 2003; Hoyer, 2005). Noch in der Vorbereitungsphase des Versuchs starb das Tier 0214 im Amsterdamer Zoo an den Folgen einer Zahnerkrankung (persönliche Mitteilung M.J. Hoyer, 2004). Der verbliebene Kleinkantschil 0014 war zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion 3 Jahre, 10 Monate und 10 Tage alt und wog 1720 g.

Die Artzuordnung der in europäischen Zoos gezüchteten Kleinkantschile ist unklar: die traditionelle Systematik der Tragulidae unterschied nur zwei Arten, den Großkantschil (*Tragulus napu*) und den Kleinkantschil (*Tragulus javanicus*) mit einer jeweils ungesicherten Zahl an Unterarten. Die Klassifizierung von Meijaard und Groves (2004) führte zu einer Revision der Gattung *Tragulus* (Grubb, 2005; IUCN, 2009), die drei „Art-Gruppen“, sechs Arten und bislang 23 Unterarten differenziert. Unter den zur „Art-Gruppe“ *Tragulus javanicus* gehörenden Kleinkantschilen werden vor allem anhand ihrer geographischen Verbreitung mindestens drei Arten, *T. javanicus*, *T. kanchil* und *T. williamsoni*, und bislang 16 Unterarten unterschieden (siehe Kap. 2.1.1). Da die Herkunft der Gründerpopulation wie die der Neuzugänge des in europäischen Zoos gehaltenen Kleinkantschilbestandes nicht bekannt ist, ist eine exakte taxonomische Zuordnung des Versuchstieres zu einer Art oder Unterart nicht möglich.

3.2 Die beteiligten Viren

Das persistierende nzp BVDV PvMd

Das aus fünf Kleinkantschilen (Zb.Nr. 9812, 0109, 0205, 0105 und 0213) (Abb. 6, Kap. 2.4.4.2) isolierte Virus PvMd („Pestivirus strain mousedeer“) replizierte sich ohne zpE in bovinen MDBK- und BT- sowie in geringerem Umfang porcinen Zelllinien (Grøndahl et al., 2003). Die immunhistochemische Untersuchung mit polyklonalen anti-BVDV-Sera verlief positiv. In der RT-PCR amplifizierten die „Pan-Pestivirus“ Primer CSFV6 und CSFV7 erfolgreich einen 289 bp umfassenden Abschnitt aus der 5'UTR des Isolats, das Primerpaar E2r und E2f einen 659 bp langen Abschnitt aus der für das E2-Protein kodierenden Region. Negativ verlief die RT-PCR bei Einsatz der BVDV-Subtyp-spezifischen Primer BVDV1a,

² Artis Royal Zoo, Natura Artis Magistra, Plantage Kerklaan 38-40, 1018 CZ Amsterdam, Niederlande

BVDV1b und BVDV2 (Grøndahl et al., 2003a). Durch Sequenzierung und phylogenetischen Vergleich der 5'UTR und E2-kodierenden Region wurde das Isolat als ein nzp BVDV des Genotyps 1f klassifiziert. Es zeigte größte Homologie zu dem nzp BVDV-1f-Stamm 22146/81, der in den 80iger Jahren aus Rindern im westlichen Niedersachsen isoliert worden war (Tajima et al., 2001), und weitestgehende Ähnlichkeit mit BVDV-1f-Isolaten aus Österreich, Italien, der Slowakei, Slowenien und Ungarn (Grøndahl et al., 2003a).

Das zp BVDV SH9/11

Die Isolate SH9 und SH11 wurden 1990/91 im Rahmen einer virologischen Untersuchung zum Vorkommen der BVD/MD bei Zerviden in Deutschland aus Milzproben zweier Rehe (*Capreolus capreolus*) isoliert (Frölich, 1995; Frölich und Hofmann, 1995). Beide Isolate zeigten zpE bei der Anzucht auf BEL-Zellen, wurden im direkten Immunfluoreszenzassay durch polyklonale anti-BVDV Sera erkannt und konnten mit pestivirus-spezifischen, nicht jedoch mit den verwendeten BVDV- oder CSFV-spezifischen Primern in der RT-PCR amplifiziert werden (Frölich und Hofmann, 1995). Aus der Tatsache, dass sich die Isolate in einem 156 bp umfassenden Abschnitt im Bereich der 5'UTR identisch zeigten, wurde gefolgert, dass sie demselben Pestivirus-Stamm angehören mussten und fortan als ein Stamm, SH9/11, betrachtet (Hofmann et al., 1994; Fischer et al., 1998). Die erste phylogenetische Analyse einer 241 bp umfassenden Region aus der 5'UTR des Stammes ergab eine größere Ähnlichkeit zu den BVDV Genotypen 1a und 1b als zum BVDV Genotyp 2 oder anderen Pestivirus-Isolaten (Fischer et al., 1998). In einer nachfolgenden Studie (Becher et al., 1999) wurde das Isolat SH9 durch phylogenetischen Vergleich der für das N^{pro} sowie für das E2-Protein kodierenden Region als ein BVDV des Genotyps 1d klassifiziert (*GenBank Acc. No.* AF144473 und AF144616). Eine andere Studie (Harasawa et al., 2000) stufte den BVDV-Stamm SH9/11 durch phylogenetischen Vergleich einer ca. 285 bp umfassenden Region aus der 5'UTR sowie anhand seiner Sekundärstruktur als ein BVDV-Stamm des Genotyps 1c ein.

3.3 Rechtliche Grundlagen zum Versuch

Für den Transport des Versuchstieres bedurfte es einer Tiergesundheitsbescheinigung gemäß §8 Abs. 1 BmTierSSchV (1999) in Verbindung mit Richtlinie 92/65/EWG (1992). Die Tiergesundheitsbescheinigung wurde vom amtlichen Tierarzt des Herkunftsortes (Amsterdam) ausgestellt. Transportmittel und -behältnisse waren nach §6 Abs.1 BmTierSSchV (1999) so beschaffen, „dass tierische Abgänge, Einstreu oder Futter während der Beförderung nicht herausickern oder herausfallen“ konnten. Gemäß §18 BmTierSSchV (1999) war das Transportbehältnis gekennzeichnet, so dass die Herkunft des Tieres festgestellt werden konnte. Die Ankunft des Tieres wurde der zuständigen Behörde, dem Gesundheits-, Veterinär- und Lebensmittelaufsichtsamt Tempelhof-Schöneberg, gemäß §19 Abs. 1 BmTierSSchV (1999) im Voraus angezeigt und die begleitende Tiergesundheitsbescheinigung dem zuständigen Amtstierarzt nach Ankunft unverzüglich vorgelegt.

Die Durchführung des Infektionsversuchs verlangte eine allgemeine Genehmigung nach §8 sowie eine Ausnahmegenehmigung nach §9 Abs. 2 Nr. 7 Satz 2 des TierSchG (1998). Der im Dezember 2003 erstmalig gestellte Antrag wurde im Juni 2004 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit zeitlich befristet genehmigt (Genehmigungsnummer G0308/03). Die Vorschriften zur Durchführung nach §9 sowie die zur Aufzeichnungspflicht nach §9a TierSchG (1998) wurden eingehalten und die Versuchstierhaltung während einer Besichtigung durch die zuständige Referatsleiterin überprüft.

3.4 Haltung und Fütterung

Die Haltung des Versuchstieres wie die Durchführung des Versuchs erfolgten am Bundesinstitut für Risikobewertung³. Dem Kleinkantschil wurde eine der Tierart entsprechend strukturierte Isolationsbox zur Verfügung gestellt, in der durchschnittlich 25°C Raumtemperatur und 60-80% Luftfeuchte herrschten. Ein- und Ausgänge waren mit Desinfektionsmatten versehen und auch alle passierenden Materialien wurden keimreduzierenden Maßnahmen unterzogen.

Die Fütterung des Versuchstieres erfolgte nach den Vorgaben aus dem Artis Royal Zoo, Amsterdam (Diätplan siehe Kap. 9.2).

3.5 Beobachtungszeitraum

Anfänglich war ein gesamter Beobachtungszeitraum von 365 Tagen geplant. Die experimentelle Infektion erfolgte am Tag 85 nach Einstellung und der Beobachtungszeitraum *p.i.* hätte somit 280 Tage betragen. Tatsächlich betrug der gesamte Beobachtungszeitraum 210 Tage. 125 Tage *p.i.* mußte der Kleinkantschil wegen Abszessbildung und infauster Prognose eingeschläfert werden. Die Euthanasie erfolgte unter Inhalationsnarkose durch intrakardiale Injektion von 5 ml Phenobarbital (Narcoren[®], Merial, Hallbergmoos, D).

3.6 Experimentelle Infektion

Die experimentelle Superinfektion des PI Kleinkantschils erfolgte am Tag 85 nach Einstellung (= Tag 0 *p.i.*). Unter Narkose wurden 2 ml einer 10^{5,5} KID₅₀/ml Virussuspension des zp BVDV Stammes SH9/11 über eine sterile Knopfkanüle intranasal inokuliert (Abb. 7). Zu Anzucht und Titration des BVDV-Stammes siehe Kapitel 3.9 und 3.10.

3.7 Klinische Untersuchung und Probengewinnung

Der Allgemeinzustand des Versuchstieres wurden dreimal täglich adspektorisch kontrolliert und zusammen mit Futteraufnahme und Kotabsatz protokolliert. Diese täglichen Untersuchungen beinhalteten die Beurteilung von Haltung, Verhalten, Bewusstsein, Gang,

³ Bundesinstitut für Risikobewertung, Standort Marienfelde, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, D

Haut und Haarkleid, Ernährungszustand und Atmung sowie eine sensorische Beurteilung des Kots. Unter Narkose wurden wöchentlich, in konstanter Abfolge Blut-, Nasensekret-, Speichel- und Kotproben entnommen, Rektaltemperatur (Digitalthermometer Flex, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen, D) und Körpermasse (Kleintierwaage, Soehnle GmbH & Co. KG, Nassau, D) bestimmt und der Kleinkantschil einer eingehenden klinischen Untersuchung unterzogen. Beobachtungen und Befunde der täglichen und wöchentlichen Untersuchungen wurden in Protokollvorlagen (siehe Kap. 9.3) festgehalten. Die Messwerte Werte zu Rektaltemperatur und Körpermasse wurden mit Hilfe des Software-Programms Excel 2000® dokumentiert, grafisch dargestellt und Kenngrößen zu ihrer Lage und Streuung bestimmt. Zweimalig, an den Tagen 7 und 125 *p.i.*, wurde eine Elektroejakulation vorgenommen.



Abb. 7: Experimentelle Infektion

Immobilisation

Um eine klinische Untersuchung und Probengewinnung zu ermöglichen, wurde der Kleinkantschil mit einem Fangsack (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.med.vet. A. Ochs, Zoologischer Garten Berlin) eingefangen und mittels Inhalationsnarkose (Inhalationsnarkosegerät Spartan™, MatrX Medical Inc., Le Nid d'Aigle, CH) immobilisiert. Nach dem Einfangen wurde das Tier manuell so im Fangsack fixiert, dass ihm eine, Nasenöffnung und Maulspalte umschließende, Atemmaske zur Inhalation aufgesetzt werden konnte (Abb. 8).



Abb. 8: Inhalationsnarkose

Die Einleitung der Narkose erfolgte mit einer Dosierung von 5 Vol.% Isofluran (Isobar[®], Essex Tierarzney, München, D) und einer Sauerstoffflussrate (medizinischer Sauerstoff, Linde AG, Pullach, D) von 2 l/Min. Sobald das Tier keine Abwehrbewegungen mehr zeigte und die Muskulatur relaxierte, wurde die Isoflurandosis zur Aufrechterhaltung der Narkose auf 2 Vol.% reduziert, das Tier aus dem Fangsack genommen und auf dem Untersuchungstisch platziert. Die Vitalfunktionen des Tieres wurden durch regelmäßige manuelle Kontrolle von Herzfrequenz und -rhythmus, Atemfrequenz und -tätigkeit, Schleimhautfarbe und Puls überwacht. Nach Abschluss von klinischer Untersuchung und Probenentnahme wurde die Isofluranzufuhr gestoppt und das Tier bis zum Wiedereinsetzen von Muskeltonus und Lidreflex mit Sauerstoff versorgt. Mit dem Einsetzen erster Abwehrreaktionen wurde der Kleinkantschil an eine geschützte Stelle der Box zurückgesetzt und bis zum Wiedererlangen seiner normalen Reaktions- und Bewegungsfähigkeit unter Beobachtung gehalten.

Blutentnahme

Die wöchentliche Blutentnahme erfolgte nach Rasur und Desinfektion der Haut (Softasept[®]N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) wechselnd aus der V. radialis der rechten bzw. linken Vordergliedmaße. Die Punktion der Vene erfolgte mit einer Einmalkanüle (Sterican[®], Gr. 1, 0,9x40 mm BL/LB, 20 Gx1½“, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) nach Entfernen des Konus. 1-1,5 ml Blut wurde in EDTA-beschichteten, 5 ml Blut in Natrium-Zitrat-Lösung enthaltenden Probenröhrchen (Sarstedt Ag & Co., Nürnberg, D) aufgefangen. Aus EDTA-Blut wurden im Anschluss an die Blutentnahme zwei Ausstriche angefertigt (gebrauchsfertige Objektträger, 76x26 mm, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D).

Entnahme und Aufbewahrung von Nasensekret und Speichelproben

Zur Gewinnung von Nasensekret und Speichelproben fanden produktionssterile Abstrichtupfer (Copan Italia S.p.a., Brescia, I) Verwendung, die nach Entnahme der Probe in mit 1,5 ml DMEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) gefüllte 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt, D) eingetaucht und bis zur weiteren Verwendung kontinuierlich gekühlt wurden.

Entnahme und Aufbewahrung von Kotproben

Es wurde möglichst frischer Kot vom Boden gesammelt oder unter Narkose direkt aus dem Rektum entnommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt, D) bei -80°C eingefroren.

Gewinnung von Ejakulat

Ejakulat wurde an den Tagen 7 und 125 *p.i.* durch Elektrostimulation (Elektroejakulator Modell 14, Dalzell Medical Systems, The Plains, Virginia, USA) mittels einer für den Feldhasen (*Lepus europaeus*) entwickelten Rektalsonde (Hildebrandt et al., 2000) gewonnen. Das Verfahren wurde von Dr. vet. med. R. Hermes⁴ durchgeführt. Nach Positionierung der Sonde im Enddarm des Tieres wurde der Penis manuell ausgeschachtet

⁴ Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Alfred-Kowalke-Str. 17, 10315 Berlin, D

und gereinigt. Die elektrischen Stimulationen erfolgten im Niedervoltbereich ($U_{\max} = 5 \text{ V}$, $I_{\max} = 100 \text{ mA}$) und dauerten jeweils längstens 5 (+/- 1) Min. Das Ejakulat wurde in einem autoklavierten 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt, D) aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung kontinuierlich gekühlt.

In Kapitel 9.4 findet sich eine tabellarische Übersicht zu den *a.i.* und *p.i.* entnommenen Blut-, Nasensekret-, Speichel-, Kot- und Ejakulatproben.

Entnahme und Aufbewahrung von Organproben

Die Obduktion des Tieres erfolgte unmittelbar nach Eintritt des Todes im Vorraum der Isolationsbox. Sektion und Entnahme von Organ- und Gewebeproben für die histologische, immunhistochemische und virologische Untersuchung fanden am auf dem Rücken gelagerten Tierkörper statt. Die für die histologische und immunhistochemische Untersuchung bestimmten Proben wurden in 4%igem neutralgepuffertem Formalin (Protokoll siehe Kap. 9.1) während 48 Stunden fixiert. Proben von Haut, Zunge, Gaumenmandel, Groß- und Kleinhirn, Ln. retropharyngealis lateralis, Milz und Ileum wurden zudem in Aluminiumfolie eingewickelt und für den immunhistochemischen Nachweis von BVDV in einem mit flüssigem Stickstoff (Linde AG, Pullach, D) gefüllten, tragbaren Container (Cryoson GmbH, Schöllkrippen, D) schockgefroren. Die für den Nukleinsäure-Nachweis mittels RT-PCR bestimmten Proben wurden in autoklavierte 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt, D) gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Für die kulturelle Virusisolierung wurden Proben von Nasen- und Maulschleimhaut, Zunge, Speicheldrüse, Speiseröhre, Pansen, Labmagen, Milz, Niere, Hoden und Ln. cervicalis superficialis in autoklavierte 2 ml Reaktionsgefäße gegeben bis zur weiteren Verwendung kontinuierlich gekühlt.

Eine tabellarische Auflistung der Probenmaterialien und ihrer weiteren Verwendung liefert Tabelle 2. Die Kapitel 3.8 bis 3.17 beschreiben die weiterführenden Laboruntersuchungen.

Tab. 2: Liste der Probenmaterialien und der jeweils weiteren Verwendung

| Probenmaterial | weitere Verwendung |
|---------------------------------|---|
| EDTA-Blut | Bestimmung von Gesamtleukozytenzahl und Differenzialblutbild |
| Natrium-Zitrat-Blut | Isolierung der Leukozytenfraktion und Nachweis von BVDV mittels RT-PCR, Virusneutralisationstest |
| Nasensekret- und Speicheltupfer | Kulturelle Virusisolierung und Nachweis von BVDV mittels RT-PCR |
| Kotproben | Nachweis von BVDV mittels RT-PCR |
| Ejakulat | Nachweis von BVDV mittels RT-PCR |
| Organproben | Histologische Untersuchung, immunhistochemischer Nachweis von BVDV-Antigen, kulturelle Virusisolierung und Nachweis von BVDV mittels RT-PCR |

3.8 Bestimmung von Gesamtleukozytenzahl und Differenzialblutbild

1-1,5 ml EDTA-Blut gelangten zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl in das Labor des Instituts für Veterinärmedizinische Diagnostik⁵. Die Zählung erfolgte automatisch durch ein konduktometrisch und optoelektronisch arbeitendes Blutzellzählgerät (CellDyn 3500®, Abbot GmbH & Co.KG, Ludwigshafen/Wiesbaden, D). Als Standard diente der kleine Wiederkäuer Ziege, zur Sicherung der Zählweise wurden die Gesamtleukozytenzahl *a.i.* parallel auch manuell nach der bei Kraft (1999) beschriebenen Vorgehensweise mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die getrockneten Blutausstriche wurden im Labor der Klinik für Klauentiere des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin⁶ mittels der panoptischen Färbung nach Pappenheim (Kraft, 1999) gefärbt und abschließend durch mikroskopische, meanderförmige Auszählung von 2 x 100 Zellen das Differenzialblutbild bestimmt. Mit Hilfe des Software-Programms Excel 2000® wurden die Messwerte dokumentiert, grafisch dargestellt und Kenngrößen zu ihrer Lage und Streuung bestimmt.

3.9 Zellkulturen

Für die Virusvermehrung, den Virusneutralisationstest sowie für die kulturelle Virusisolierung von potenziellem Virus in Nasensekret-, Speichel- und Gewebeproben wurden zertifiziert BVDV-freie MDBK- oder BFL-Zellen verwendet. Beide Zelllinien waren ehemals von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems, bezogen worden. Ursprung der Zelllinien war die American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA).

Die Zellzucht erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D) bei 37°C, 5% CO₂ und 70-80% Luftfeuchtigkeit (Begasungsbrutschrank I, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D) unter täglicher makroskopischer und mikroskopischer Kontrolle. Als Wachstumsmedium für die Zellkultur diente mit 5% FKS versetztes DMEM (beide Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Das Erhaltungsmedium enthielt 2% FKS. Nach Bildung eines geschlossenen Zellrasens wurden die Zellen unter Einwirkung einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %/nM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) vom Flaschenboden gelöst, mehrmals resuspendiert und in der Folge im Verhältnis 1:2 bis 1:4 (BFL-Zellen) bzw. bis 1:10 (MDBK-Zellen) passagiert.

3.10 Virusvermehrung und -titration

Die Vermehrung der BVDV-Stämme SH9/11, Grub 313/83 und NADL für die experimentelle Infektion bzw. den Einsatz im VNT erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D) durch Beimpfen eines zu mindestens 80% geschlossenen Zellrasens zertifiziert BVD-freier MDBK-Zellen. Die zp BVDV-Stämme Grub 313/83 (Frölich, 1993) und NADL (Collett et al. 1988) waren ehemals von G. Witzigmann, Zentralinstitut für

⁵ Institut für Veterinärmedizinische Diagnostik, Nicolaistr. 22, 12247 Berlin, D

⁶ Klinik für Klauentiere, Fachbereich Veterinärmedizin, FU Berlin, Königsweg 65, 14163 Berlin, D

Tiergesundheit, Grub, zur Verfügung gestellt worden (Frölich, 1993). Zur Herkunft des zp BVDV-Isolats SH9/11 siehe Kap. 3.2.

Nach Adsorption von 300 µl der jeweiligen Virussuspension für 1 Stunde bei 37°C wurde die Zellkultur mit DMEM und 2% FKS (beide Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) überschichtet und bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet (Begasungsbrutschrank II, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Es erfolgte eine tägliche mikroskopische Kontrolle auf das Vorliegen zp Effekte, die sich in Form von Auflockerung des Zellverbandes, Vakuolenbildung und schließlich Ablösung des Zellverbandes vom Flaschenboden zeigten. Drei bis vier Tage nach Beimpfung wurden die Zellen einer thermischen Beugung (dreimaliges Einfrieren bei -80°C und Tauen bei Raumtempertaur) unterzogen und der Überstand durch 15 Min. Zentrifugation bei 4000 U/Min. und 4°C (Zentrifuge Megafuge 1.0 R®, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D) vom Zelldetritus getrennt. Die Virussuspensionen wurden in Portionen zu 1,0 ml bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Virustitration erfolgte als End-Punkt-Verdünnungsmethode (Büttner, 2002): nach Anlegen einer logarithmischen Verdünnungsreihe der Ausgangsvirussuspension von 10¹-10⁶ wurden je Verdünnungsstufe vier Vertiefungen einer 96-Lochplatte (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D) mit 100 µl verdünnter Virussuspension beschickt und während einer Stunde inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl Zellsuspension (ca. 3 x 10⁵ Zellen/ml) je Vertiefung wurden die Platten während vier Tagen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Begasungsbrutschrank II, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Die anschließende Berechnung des Titers der Virussuspension als kulturinfektiöse Dosis pro Milliliter (KID₅₀/ml) erfolgte nach der Formel von Spearman und Kaerber (1985). Die für den VNT notwendige KID₅₀ wurde durch entsprechende Verdünnung der Virussuspension eingestellt. Die Virusstämme erreichten folgende Titer:

| | | |
|-----------|-------------|---|
| BVD-Stamm | SH9/11 | 10 ^{5,5} KID ₅₀ /ml |
| | NADL | 10 ⁵ KID ₅₀ /ml |
| | Grub 313/83 | 10 ^{5,5} KID ₅₀ /ml |

3.11 Kulturelle Virusisolierung

Zum Nachweis der potenziell in Nasensekret-, Speichel- und Organproben vorhandenen Viren wurden diese zunächst auf zu mindestens 80% geschlossenen Monolayern zertifiziert BVD-freier BFL-Zellen angezüchtet. Einen Tag vor Inokulation wurden in jede Vertiefung einer 6-Loch-Zellkultur-Platte (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D) 2,5 ml Zellsuspension eingesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Begasungsbrutschrank I, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D).

In DMEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) aufgenommene Nasensekret- und Speicheltuper wurden mithilfe einer sterilen Kanüle (Sterican®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) an der Wandung des Röhrchens ausgedrückt, die gesamte Flüssigkeit aufgenommen und durch einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porengröße (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt, D) überführt. Organproben wurden gewogen, im Verhältnis 1:10 mit DMEM verdünnt, homogenisiert und

für 10 Min. bei 4000 U/Min. zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0 R[®], Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Der Überstand wurde durch einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porengröße steril filtriert. Zur Inokulation der Zellkulturen wurde das Kulturmedium über den Monolayern entfernt, der Zellrasen mit 250 µl des jeweiligen Filtrats beimpft und die Platten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Begasungsbrutschrank II, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Nach einer Stunde wurde in jede Vertiefung 2,5 ml DMEM, 2%iges FKS sowie eine 2%ige Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 E/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) gegeben. Nach 5-tägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die beimpften Monolayer einer thermischen Beugung (dreimaliges Einfrieren bei -80°C und Tauen bei Raumtempertaur) unterzogen und die entstandenen Zell-Virus-Suspensionen 15 Min. bei 4000 U/Min. und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Beimpfung frischer Zellrasen verwendet, das Pellet wurde aufbewahrt. Nach drei weiteren Passagen von je 5 Tagen wurde der Überstand jeder Zellkultur abgesaugt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Der Nachweis viraler Nukleinsäure mittels RT-PCR erfolgte an Zellen der zweiten Passage.

3.12 Virusneutralisationstest

5 ml Natrium-Zitrat-Blut wurden für 20 Min. bei 4°C und 3000 U/Min. zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0 R[®], Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Das überständige Plasma wurde abpipettiert, nochmals bei 4000 U/Min. zentrifugiert, in 500 µl Portionen aufgeteilt und überzählige Plasmaproben bei -20°C eingefroren. Zur Weiterverwendung des Blutkuchens siehe Kapitel 3.13.

Mit Hilfe des VNT, modifiziert nach der Mikrotiter-Methode von Frey und Liess (1971), wurden die wöchentlich gewonnenen Proben auf ihre neutralisierende Eigenschaft gegenüber dem zur experimentellen Infektion eingesetzten BVDV Stamm SH9/11 sowie den BVDV Isolaten Grub 313/83 (Frölich, 1993) und NADL (Collett et al. 1988b und c) untersucht. Vor dem Einsatz im VNT wurden die Proben zur Inaktivierung von Komplement und Virus im Wasserbad 30 Min. auf 56°C erhitzt (Wasserbad Medax[®], Medax Nagel GmbH, Kiel, D) und mithilfe eines Spritzenfilters von 0,45 µm Porengröße (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) steril filtriert. Der VNT erfolgte in 96-Lochplatten (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D) mit 50 kulturinfektiösen Dosen pro Kavität und logarithmischen Serumverdünnungen zur Basis 2. 50 µl des zuvor mit DMEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) 1:4 vorverdünnten Plasmas wurden zu 50 µl DMEM in die ersten vier Vertiefungen der obersten Reihe der Mikrotiter-Platte gegeben. Anschließend wurden die Proben in Zweierschritten von 1:4 bis 1:512 in 50 µl DMEM verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl der zuvor auf 1000 KID₅₀/ml eingestellten jeweiligen Virussuspension und vorsichtigem Schwenken der Platte wurde das Gemisch bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Begasungsbrutschrank II, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Nach 1 Std. wurden in jede Vertiefung 100 µl einer MDBK Zellsuspension (ca. 3 x 10⁵ Zellen/ml) gegeben und die Platten für vier Tage bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Jede Platte enthielt Virus- und Zellkontrollen und wurde täglich auf mögliche zpE untersucht. Nach vier Tagen wurden die Zellen mit 3%igem Formalin (Merck KgaA, Darmstadt, D) fixiert und nach Giemsa (Merck KgaA, Darmstadt, D) gefärbt. Die Auswertung der VNTs erfolgte

mikroskopisch. Der Neutralisationstiter wurde als der reziproke Wert derjenigen Verdünnung definiert, bei der eine 50%ige Hemmung stattgefunden hat. Die Berechnung des Titers erfolgte nach der Methode von Spaermann und Kaerber (1985), Titer $\geq 1:4$ wurden als positiv bewertet.

3.13 Isolierung und Aufarbeitung der Leukozytenfraktion

5 ml Natrium-Zitrat-Blut wurden für 20 Min. bei 4°C und 3000 U/Min. zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0 R[®], Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Das überständige Plasma wurde abpipettiert, der Blutkuchen mit PBS pH 7,4 (Protokoll siehe Kap. 9.1) aufgefüllt und das Gemisch vorsichtig geschwenkt. Die Separation der weißen Blutzellen erfolgte über eine Dichtegradienten-Zentrifugation: 3 ml Trennlösung (Biocoll[®], Dichte 1,077 g/ml, Biochrom AG, Berlin, D) wurden in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen (VWR International GmbH, Darmstadt, D) vorgelegt, mit dem Gemisch überschichtet und das Röhrchen für 35 Min. bei 4°C und 2000 U/Min. zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0 R[®], Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Der sich absetzende Leukozytensaum wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen, in 10 ml PBS resuspendiert und nochmals für 10 Min. bei 4°C und 3000 U/Min. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Leukozytenzentrifugat resuspendiert und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt, D) überführt. Waren noch Beimengungen roten Blutfarbstoffs sichtbar, wurden 900 μ l 0,2%iger und 1 Min. später 100 μ l 7,2%iger Natriumchloridlösung (Protokoll siehe Kap. 9.1) hinzugegeben und das Gefäß für 2 Min. bei 4°C und 2000 U/Min. zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge Fresco[®], Heraeus Holding GmbH, Hanau, D). Dieser Vorgang wurde wiederholt bis keine Beimengungen roten Blutfarbstoffs mehr sichtbar waren. Abschließend wurde das Leukozytenzentrifugat in 900 μ l PBS aufgenommen, nochmals für 10 Min. bei 4°C und 2000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand abgehoben und das Pellet in 50 μ l PBS bei -80°C tiefgefroren.

3.14 Nachweis von BVDV im Probenmaterial mittels RT-PCR

Im Rahmen einer Voruntersuchung wurden Sequenzen aus der 5'UTR des persistierenden sowie des zur Superinfektion eingesetzten zp BVDV mittels RT-PCR amplifiziert und analysiert. Zur Anwendung kamen an den Tagen 75 und 35 *a.i.* gesammelte Kotproben bzw. mit dem zp BVDV inokulierte MDBK-Zellen. RNA-Isolierung, RT-PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung erfolgten wie im Folgenden für die Probenmaterialien beschrieben. Ziel dieser Voruntersuchung war das Design spezifischer Primer für die beteiligten Viren PvMd und SH9/11, das nach den bei Hyndmann und Mitsuhashi (2003) gegebenen Empfehlungen erfolgte (Tab. 3 und Abb. 9).

RNA-Isolierung

Zum Nachweis von BVDV in Ausscheidungen, Organen und Ejakulat wurde zunächst die gesamte RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kit[®] (Qiagen, Hilden, D) nach dem Protokoll des Herstellers aus den einzelnen Proben extrahiert. Kotproben, die aus Citratblut

isolierte Leukozytenfraktion und Ejakulat kamen dabei direkt zur Verwendung, Nasensekret-, Speichel- und Gewebeproben nach Vermehrung des potenziell vorhandenen Virus in Kulturzellen.

Das Extraktionsverfahrens basiert auf der Freisetzung der Gesamt-RNA durch Behandlung der Proben mit Lysispuffer und selektiver Anbindung der RNA-Moleküle an spezielle, auf der Basis eines Silikatgels aufgebaute Membranen in den RNeasy spin columns®. DNA-Kontaminationen sowie andere unspezifisch bindende Zellbestandteile werden in drei Schritten durch den Einsatz verschiedener Waschpuffer entfernt und die isolierte, membrangebundene RNA abschließend in RNase-freiem Wasser eluiert. Das Eluat wurde, sofern es nicht direkt weiterverwendet wurde, zunächst bei -20°C, dann bei -80°C eingefroren, bei Bedarf zügig getaut und während der unmittelbaren Verwendung auf Eis gelagert.

Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Der RT-Ansatz (25 µl) umfasste je Einzelreaktion:

- 10 µl RNAhaltiges-Eluat
- 1 µl Randomhexamerprimer (500 µg/ml) (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
- 5 µl M-MLV-RT 5 x Transkriptionspuffer (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
- 2 µl dNTP-Stammlösung (25 mM je dNTP) (IBM Fermentas GmbH, St- Leon-Rot, D; Protokoll siehe Kap. 9.1)
- 0,5 µl RNase (Ribonuklease)-Inhibitor (20 Units/µl) (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA)
- 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase (200 Units/µl) (Promega, Madison, Wisconsin, USA)

Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurde die eluierte RNA zunächst nur mit den Randomhexamerprimern versetzt und im Thermocycler Tgradient® (Whatman Biometra GmbH, Goettingen, D) für 10 Min. auf 68°C erhitzt. Nach Zugabe der übrigen Reagenzien wurden die Proben für 15 Min. bei 37°C und für 30 Min. bei 42°C inkubiert. Im letzten Schritt von 5 Min. bei 99°C wurden die Reverse Transkriptase inaktiviert und die entstandenen RNA-cDNA-Heteroduplexe denaturiert, bevor die Reaktionsansätze auf 8°C abgekühlt wurden. Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung kurzfristig bei -4°C oder für längere Zeit bei -20°C gelagert.

Zum Nachweis der beteiligten Viren PvMd und SH9/11 in Ausscheidungen, Geweben und Ejakulat wurden die spezifischen forward-Primer PvMd-V und SH-V in Kombination mit PEST2 sowie das Pestivirusprimerpaar BVD3_{forward} / PEST2_{reverse} (Fischer et al., 1998) eingesetzt. Das Primerpaar PvMd-V_{forward} / PEST2_{reverse} amplifizierte eine 106 bp, das Primerpaar BVD3_{forward} / PEST2_{reverse} eine 158 bp, und das Primerpaar SH-V_{forward} / PEST2_{reverse} eine 195 bp umfassende Sequenz aus dem Bereich der 5'UTR. Die Spezifität der Primer und die Größenunterschiede der amplifizierten Fragmente ermöglichten eine Unterscheidung der beteiligten BVDV-Isolate PvMd und SH9/11 (Tab. 3 und Abb. 9).

MATERIAL & METHODEN

| | |
|--------------------------|---|
| SH9/11 PvMd | 5'-GGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCATCGGATGGCTGAAGCCCTGAGTACAG 5'-..... |
| SH9/11 PvMd SH-V | GGTAGTCGTCAGTGGTTCGACA--CC-TCGGAATAAGGTCTCGAGATGC ----- 5'-GGTTCGACA--CC-TCGGAATA-3' |
| SH9/11 PvMd BVD3 | CACGTGGACGAGGGGCATGCCACAGTACATCTTAACCTGGACGGGGTTCG --- GTGGACGAGGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGAGCAGGGTTCG 5'-GTGGACGAGGGGCATGCCA-3' |
| SH9/11 PvMd PvMd-V | CCCAGGTAAAAGCAGTTTAATCAACTGTTATGGACACAGCCTGATAGGGT TTCAGGTGAAAGCGGGTAAACTACCCGTTACGGACACAGCCTGATAGGGT 5'-GTGAAAGCGGGTAAACTACCC-3' |
| SH9/11 PvMd | GCTGCAGAGGCCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCC GCTGCAGAGGCCCGCTGtA T tGcTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCC |
| SH9/11 PvMd | ACATGGAGTTGAA ----- 3' ACATGGAGTTGAA ----- 3' |

Abb. 9: Ausschnitt aus der 5'UTR des persistierenden, nzp BVDV (PvMd) und des inokulierten, zp BVDV (SH9/11) mit Kennzeichnung der Lage der spezifischen *forward* Primer PvMd-V und SH-V sowie des Pestivirusprimers BVD3

Tab. 3: Charakteristika der in der RT-PCR verwendeten Primer

| Primer | Nukleotidsequenz | Annealing-temperatur | Position ² |
|--------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|
| BVD3 ¹ | 5' GTGGACGAGGGGCATGCCCA 3' | 64 °C | 115-134 |
| PvMd-V | 5' GTAAAAGCGGGTAAACTACCC 3' | 62 °C | 167-187 |
| SH-V | 5' GGTTCGACACCTCGGAATA 3' | 60 °C | 78-98 |
| PEST2 ¹ | 5' TCAACTCCATGTGCCATGTAC 3' | 62 °C | 253-273 |

¹ Fischer et al. (1998) ² Positionen beziehen sich auf die 5'UTR des „Pestivirus strain mousedeer“ (Grøndahl et al., 2003a; *GenBank Acc.No.* AY158154)

Der 50 µl PCR-Ansatz umfasste je Einzelreaktion:

| | |
|--------|--|
| 10 µl | cDNA-Lösung |
| 5 µl | 10 x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden, D) |
| 2 µl | Magnesiumchlorid (25mM) (Qiagen, Hilden, D) |
| 1 µl | dNTP-Stammlösung (10mM je dNTP) (Protokoll siehe Kap. 9.1) |
| 1 µl | forward-Primer (10 pmol) (BioTeZ GmbH, Berlin, D) |
| 1 µl | reverse-Primer (10 pmol) (BioTeZ GmbH, Berlin, D) |
| 0,2 µl | Taq DNA Polymerase (5 Units/µl) (Qiagen, Hilden, D) |

Für den spezifischen Nachweis von SH9/11 bzw. PvMd wurde je forward-Primer ein Mastermix hergestellt (3-fach Ansatz). 40 µl des Ansatzes wurden je Einzelreaktion in ein autoklaviertes 0,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, VWR International GmbH, Darmstadt, D) vorgelegt und, räumlich getrennt, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, 10 µl der zu amplifizierenden cDNA hinzugegeben. Die PCR erfolgte im programmierbaren Thermocycler Tgradient® (Whatman Biometra GmbH, Goettingen, D). Zur Vordenaturierung wurden die Proben einmalig für 5 Min. auf 95°C erhitzt. Im Anschluss folgte eine 35-fache Wiederholung der folgenden Temperaturschritte: Denaturierung der DNA bei 94°C für 30 Sek., Hybridisierung der Primer bei 55°C für 45 Sek. und Elongation der Primer durch die DNA-Polymerase bei 72°C für 45 Sek. Nach Ende der 35 Zyklen wurden die Reaktionsansätze während einer terminalen Elongation für weitere 10 Min. bei 72°C gehalten und anschließend auf 4°C abgekühlt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz dem anstelle von cDNA steriles Wasser zugefügt wurde; als Positivkontrolle fungierten drei Ansätze, die für das jeweilige Primerpaar sicher positiv reagierende cDNA oder ein nachweislich positives PCR-Produkt enthielten.

Gelelektrophorese

Die Größe der PCR-Amplifikate wurde durch Elektrophorese in 2%igen TAE-Agarosegelen bestimmt. 0,8 g Agarose (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) wurden in 40 ml 1 x TAE-Elektrophoresepuffer (Protokoll siehe Kap. 9.1) durch Erhitzen verflüssigt und in mit Kämmen versehene Gelschlitten gegossen. Nach Erkalten des Gels und Einsetzen des Gelschlittens in die Gelelektrophoresekammer (GNA 100, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, D), wurden 8 µl DNA-Probe bzw. 5 µl der Positivkontrolle, jeweils vermengt mit 3 µl Ladepuffer (6 x Loading Dye Solution®, IBM Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D), in die Taschen des Agarosegels pipettiert. 1,5 µl eines 100 bp Markers (0,5 µg/µl) (Marker Gene Ruler™, IBM Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D) dienten als Größenvergleich. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 5 V/cm für eine Stunde. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel für 5 Min. in einem Ethidiumbromidbad (Protokoll siehe Kap. 9.1) gefärbt und anschließend unter fließendem Wasser gespült. Im Transilluminator wurden die DNA-Banden bei anschließender UV-Licht-Bestrahlung visuell beurteilt und dokumentiert.

3.15 Sequenzierung ausgewählter PCR-Amplifikate

Reinigung von PCR-Amplifikaten

Zur Sequenzierung ausgewählte PCR-Amplifikate wurden vor einer weiteren Verwendung mit Hilfe der Komponenten des QIAquick PCR Purification Kit[®] (Qiagen, Hilden, D) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Prinzip der Methode ist die selektive Anbindung der DNA-Fragmente an spezielle, auf der Basis eines Silikatgels aufgebaute Membranen in den QIAquick Spin Columns[®], wo die DNA durch Behandlung mit Waschpuffer von überschüssigen Primern, Nukleotiden, Enzymen, unspezifischen PCR-Produkten und Salzen gereinigt wird. Abschließend wurden die DNA-Fragmente durch Zentrifugation (1 Min., 13000 U/Min., 4°C, Zentrifuge Biofuge Fresco[®], Heraeus Holding GmbH, Hanau, D) in sterilem Wasser eluiert, bei -20°C gelagert oder sofort weiterverwendet.

Durchführung der Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung wurde durch Herrn D. Lieckfeldt⁷ durchgeführt. Zur Anwendung kam das BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA). Der 10 µl Sequenzierungs-PCR-Ansatz umfasste:

| | |
|------|--|
| 1 µl | BigDye [®] Ready Reaction Mix |
| 2 µl | 5 x BigDye [®] Sequencing Buffer |
| 1 µl | Primer (10 pmol) (BioTeZ GmbH, Berlin, D) |
| 6 µl | der zu sequenzierenden DNA-Fragment-Lösung |

Die Sequenzier-Reaktion erfolgte in 25 Zyklen (96°C für 10 Sek., 50°C für 5 Sek., 60°C für 1,5 Min.) im programmierbaren Thermocycler GeneAmp 2400[®] (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA). Nach Abschluß der Sequenzier-Reaktion wurde der Ansatz mit 2 µl 2,2%igem SDS (Merck KgaA, Darmstadt, D) und 8 µl sterilem Wasser versetzt und nochmals für 5 Min. auf 98°C erhitzt. Die Detektion und Analyse behindernde Salze und überschüssige Nukleotide wurden unter Einsatz von 125 µl 95%igem Ethanol (Merck KgaA, Darmstadt, D) und 30 µl 0,5 M Natrium-Azetatlösung (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) gefällt und das Präzipitat zentrifugiert (20 Min., 14 000 U/Min., Raumtemperatur). Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das verbliebene Pellet in 70%igem Ethanol (Merck KgaA, Darmstadt, D) gewaschen, nochmals zentrifugiert (10 Min., 14000 U/Min., Raumtemperatur), bei Raumtemperatur getrocknet und in 25 µl deionisiertem Formamid (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) resuspendiert.

Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte im ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) in einem Polyacrylamid-ähnlichen Polymer (POP-6TM) für 45 Min. bei 60°C. Detektion und Analyse der Sequenz wurden automatisch von der integrierten CCD-Kamera und Software (Data Collection Software v3.0, Sequencing Analysis Software v5.2) ausgeführt. Es wurden Vor- und Rückstrang sequenziert, so dass die ermittelten Sequenzen durch ein Strang-Alignment mithilfe des Computerprogramms Clustal X (Thompson et al., 1997) kontrolliert werden konnten.

⁷ Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Alfred-Kowalke-Str. 17, 10315 Berlin, D

3.16 Histologische Untersuchung

Herstellung von Paraffinschnitten

Die formalinfixierten Gewebeproben wurden nach dem Zuschneiden automatisiert in Paraffin eingebettet (Einbettautomat HypercenterXP[®], Shandon Thermo Inc., Waltham, USA). Die Entwässerung der Gewebestücke erfolgte in einer aufsteigenden, 70%igen, 80%igen, 2 x 96%igen und 3 x 99%igen Ethanol (Merck KgaA, Darmstadt, D) umfassenden Alkoholreihe. Um das vollständige Eindringen des Paraffins zu ermöglichen, folgte eine zweimalige Durchtränkung der Gewebestücke mit Xylol-Ersatz (Roti-Histol[®], Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D), bevor die Proben in Paraffin (Paraplast Plus[®], Kendall Tyco Healthcare GmbH, Neustadt a.d. Donau, D) eingebettet und in der Gießstation (Histocenter 2[®], Shandon Thermo Inc., Waltham, USA) in Blöcke gegossen wurden. Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mit einem Rotationsmikrotom (HM360[®], Microm International GmbH, Walldorf, D) mit einer Schnittdicke von ca. 3 µm. Die Schnitte wurden zunächst auf ein kaltes und nachfolgend zum Strecken kurz auf ein warmes Wasserbad überführt, auf Standardobjektträger aufgezogen und anschließend im Wärmeschrank bei 60°C getrocknet.

Färbung

Für die histologische Beurteilung wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin & Eosin (HE) Böck (1989) gefärbt: nach Entparaffinierung der Schnittpräparate durch 2 x 10 minütiges Tränken in Xylol-Ersatz, Rehydrierung des Gewebes in einer absteigenden, 2 x 100%igen, 96%igen, 80%igen und 70%igen Ethanol für je 2 Min. umfassenden Alkoholreihe und Spülen der Schnitte in Aqua dest., folgte eine 8-10 minütige Kernfärbung in Hämalaun nach MAYER (Böck, 1989) (Protokoll siehe Kap. 9.1). Anschließend wurden die Präparate in Aqua dest. gespült und der Farbstoff unter fließendem Leitungswasser für 10 Min. gebläut und fixiert. Die Färbung der basischen Bestandteile erfolgte während 3 Min. in 0,2%igem, angesäuertem Eosin (Protokoll siehe Kap. 9.1). Durch zügiges Durchlaufen einer aufsteigenden, 70%igen, 80%igen, 96%igen und 2 x 100%igen Ethanol für je 1 Min. umfassenden Alkoholreihe wurde das Gewebe wieder dehydriert und 2 x 2 Min. in Xylol-Ersatz getränkt, bevor die Präparate mit Kunstharz (Entellan[®], Merck KgaA, Darmstadt, D) eingedeckt wurden.

3.17 Immunhistochemischer Nachweis von BVDV-Antigen

Der immunhistologische Nachweis von BVDV-Antigen erfolgte durch Dr. vet. med. M. Hilbe am Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich⁸ in Anlehnung an die bei Thür et al. (1996, 1997 und 1998) beschriebenen Methoden. Alle verwendeten primären monoklonalen Antikörper (mAk) (Tab. 4) stammten aus der Maus und lagen in unkonjugierter Form vor.

Die primären mAk Ca3 und Ca34, erkennen das Strukturprotein E2 der meisten BVDV-Stämme (Thür et al., 1997, Bolin et al., 1988), binden jedoch nicht an CSFV- oder BDV-Isolate (Thür et al., 1997). Ebenso BVDV-spezifisch verhält sich der mAk C42: er bindet an

⁸ Institut für Veterinärpathologie, Universität Zürich, Vetsuisse Fakultät, Winterthurer Str. 268, 8057 Zürich, CH

das Strukturprotein E^{rns} von BVDV-Stämmen, reagiert jedoch nicht mit CSFV- oder BDV-Isolaten (Moennig et al., 1987, Thür et al., 1997). Die mAk Ca3, Ca34 und C42 wurden in einer kommerziell erhältlichen Kombination (Dr. Bommeli AG, Bern-Liebefeld, CH) an Gefrierschnitten angewendet, der mAk C42 einzeln auch an Paraffinschnitten. Als pestivirus-spezifisch gelten die mAk C16 (Dr. Bommeli AG, Bern-Liebefeld, CH) und 15c5: der mAk C16 bindet an das Nichtstrukturprotein NS2-3 und erkennt sowohl BVDV- als auch CSFV-Isolate (Moennig et al., 1987), während der besonders für formalinbehandelte Gewebe geeignete mAk 15c5 (Haines et al., 1992) mit dem Strukturprotein E^{rns} sowohl von BVDV- als auch von CSFV- und BDV-Isolaten reagiert (Corapi et al., 1990, Thür et al., 1997). Bei den mAk C42 und 15c5 handelt es sich um Schenkungen von Prof. Dr. Moennig, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland, und Dr. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, USA, an das Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich.

Tab. 4: Spezifität der zum immunhistochemischen Nachweis von BVDV-Antigen verwendeten, primären monoklonalen Antikörper (mAk)

| mAk | Ca3/34-C42 | C16 | C42 | 15c5 |
|------------|---|--------------------------------|------------------------------------|---|
| Spezifität | E2 - E ^{rns} BVD-spezifisch | NS2-3 Pestivirus-spezifisch | E ^{rns} BVD-spezifisch | E ^{rns} Pestivirus-spezifisch |
| Anwendung | Gefrierschnitt | | Paraffinschnitt | |

Zur Darstellung der primären mAk wurde das kommerziell erhältliche EnVision+System-HRP[®] (Dako Cytomation A/S, Glostrup, DK) verwendet. Die Methode basiert auf dem Prinzip einer indirekten Immunperoxidase-Reaktion, bei der Anti-Maus- (Sekundär-) Antikörper aus der Ziege sowie eine große Menge des Markerenzym Peroxidase an einen Dextran-Polymerterso gekoppelt vorliegen (Abb. 10). Die Sichtbarmachung der im positiven Fall gebildeten Immunkomplexe erfolgte durch den Einsatz von AEC als Chromogen (Aminoethyl Carbazol Substrat Kit[®], Zymed Laboratories Inc., San Francisco, Kalifornien, USA). Peroxidasen katalysieren bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation des Chromogens und bilden dabei unter Freisetzung molekularen Sauerstoffs rote bis rotbraune Farbkomplexe.

Erstellung der Präparate

Erstellung und Vorbehandlung der **Gefrierschnitte**: zunächst erfolgte eine 30minütige Adaptation der schockgefrorenen Gewebeproben auf eine Temperatur von -20°C. Anschließend wurden von jeder Probe einzelne Segmente mit Hilfe von Gefriermedium (Tissue-Tek[®], Electron Microscopy Sciences, Hatfield, UK) auf den Objekthalter des Kryostaten (Frigocut 2800[®], Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D) aufgefroren und 6-8 µm

dicke Schnitte auf positiv geladene Objektträger aufgezogen. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in -20°C kaltem Azeton fixiert.

Erstellung und Vorbehandlung von **Paraffinschnitten**: das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mit einem Schlittenmikrotom (HM355S[®], Microm International GmbH, Walldorf, D) in einer Schnittdicke von 2-3 µm. Die Schnitte wurden zum Strecken kurz auf ein ca. 38°C warmes Wasserbad überführt, auf positiv geladene Objektträger aufgezogen und anschließend im Wärmeschrank bei 37°C über Nacht getrocknet. Zur Entparaffinierung wurden die Präparate 4 x 5 Minuten in Xylol eingestellt und in einer absteigenden, 100%igen Isopropylalkohol, 96%iges und 70%iges Ethanol sowie Wasser umfassenden Reihe für je 2 x 5 Minuten rehydriert. Anschließend wurden die Präparate in Hämatoxylin für 5 Min. gegengefärbt und für 5 Min. gewässert. Der letzte Schritt in der Vorbehandlung der Paraffinschnitte galt der Antigendemaskierung. Durch die Formalinfixation kann es zu Aldehydvernetzungen oder zu einer Veränderung der Tertiärstruktur von Proteinen kommen, die die betreffenden Epitope vor allem für monoklonale Antikörper undetektierbar werden lassen (Antigenmaskierung) (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Zur Demaskierung wurden die Präparate bei Raumtemperatur für 10 Min. in einer feuchten Kammer mit einer 0,05%ig in PBS (pH8) verdünnten Protease aus *Streptomyces griseus* (Pronase[®], Dako Cytomation A/S, Glostrup, DK) inkubiert.

Immunhistochemischer Nachweis

Zur Hemmung endogener Peroxidaseaktivität, die zu unspezifischer Hintergrundfärbung führen kann, wurden zunächst alle Schnitte für 5 Minuten mit je 100 µl 3%iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert. Die Wasserstoffperoxidlösung wurde anschließend mit Wasser entfernt und die Präparate 3 x 5 Min. in PBS (pH8) gespült. Nach ihrer Trocknung erfolgte die Inkubation der Präparate für 1 Std. bei 37°C mit den monoklonalen Primärantikörpern. An den Gefrierschnitten kamen die 1:100 in PBS verdünnten, monoklonalen Primärantikörper Ca3/34-C42 und C16 zur Anwendung, an den formalinfixierten Präparaten die 1:400 bzw. 1:10000 verdünnten, monoklonalen Primärantikörper C42 und 15c5. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Präparate vorsichtig mit PBS ab gespült, für 3 x 5 Minuten in frisches PBS getaucht und trockengetupft. Es folgte eine 30 minütige Inkubation der Proben mit dem Peroxidase-konjugierten Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper, nach deren Ende die Präparate wiederum mit PBS ab gespült, 3 x 5 Minuten in frischen PBS getaucht und getrocknet wurden.

Die Sichtbarmachung der Sekundärantikörper erfolgte durch Zugabe von AEC und weiteren Reagentien des Aminoethyl Carbazol Substrat Kit[®] nach Angabe des Herstellers. Die Inkubationsdauer betrug durchschnittlich 10-15 Min. (Raumtemperatur). Nach Beendigung der Farbreaktion wurde die AEC-Lösung mit Wasser ab gespült, die Gefrierschnitte mit Hämatoxylin für 20 Sek. gegengefärbt und abschließend alle Schnitte mit Glyzeringelatine (Kaisers, Merck KGaA, Darmstadt, D) eingedeckt.

Bei jeder immunhistochemischen Reaktion wurde als Positivkontrolle ein Präparat der Schilddrüse eines PI Kalbes aus dem Sektionsgut des Instituts mitgeführt. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers mit nachfolgender Färbung auszuschließen, wurden als

Negativkontrolle Präparate desselben Tieres mit PBS anstelle eines Primärantikörpers inkubiert.

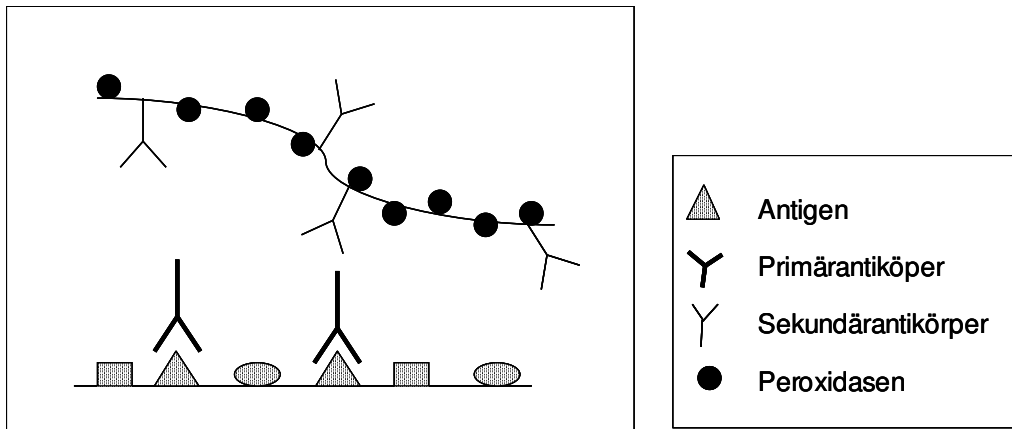


Abb. 10: Schematische Darstellung einer indirekten Immunperoxidase-Reaktion zum Nachweis von BVDV-Antigen

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Untersuchungen *intra vitam*

4.1.1 Klinischer Verlauf

Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 210 Tagen demonstrierte der Kleinkantschil ein aufmerksames Verhalten, mit am Tag überwiegenden Ruhephasen und Aktivitätszeiten am Morgen und Abend. Das Allgemeinbefinden wurde durchgehend als gut beurteilt. Sowohl vor als auch nach Superinfektion zeigte der Kleinkantschil in unregelmäßigen Abständen einzelne Tage oder kurze Phasen reduzierter Futteraufnahme, die sich in der wöchentlich bestimmten Körpermasse widerspiegeln (Abb. 11).

Die Fäzes waren ausnahmslos von fester Konsistenz sowie arttypischer Form und Menge. Einzige Abweichung stellten seromuköse Beimengungen an den Tagen 83-85 *p.i.* dar. Am Tag 6 *p.i.* ließ sich ein leichter nasaler Stridor vernehmen, der innerhalb der folgenden 2 Tage wieder verschwand. Am Tag 42 *p.i.* konnten unter Narkose geringgradige petechiale Blutungen an der rechten Nasenöffnung beobachtet werden. Über den gesamten Untersuchungszeitraum fand sich über dem Brustbein eine reaktionslose Hautschwiele.

Die Atemfrequenz betrug im Mittel 64 Atemzüge pro Min., je nach Erregtheitszustand mit Minimal- und Maximalwerten von 40 bzw. 80. Unter Narkose sank die Atemfrequenz auf durchschnittlich 43 Atemzüge pro Min. Die ausschließlich unter Narkose bestimmte Herzfrequenz betrug durchschnittlich 160 Schläge pro Min. mit Minimal- und Maximalwerten von 140 bzw. 200.

In der Maulhöhle konnten geringgradiger Zahnstein an Prämolaren und Molaren sowie eine geringgradige chronische Gingivitis festgestellt werden. Am Tag 28 *a.i.* frakturierte durch ein Aufpralltrauma während einer Fangaktion der rechte obere Kaninus in Höhe des proximalen Drittels der Zahnkrone. Der übriggebliebene Teil des Zahns war fest im Zahnfach verankert. Der Kleinkantschil zeigte keinerlei Schmerzäußerungen oder Veränderungen in seinem Verhalten, dennoch wurde das Tier über einen Zeitraum von 14 Tagen prophylaktisch antibiotisch versorgt (Langzeitpenicillin und Dihydrostreptomycin, 0,1 ml s.c.; aniMedica, Senden-Bösensell, D).

121 Tage *p.i.* zeigte sich rechts, seitlich des Nasenbeins eine zunächst kirschkernegroße Schwellung, die bis zum Tag 125 *p.i.* auf 4 x 1 cm Größe anwuchs und sich zu diesem Zeitpunkt bis zum Stirnbein erstreckte. Nach Erfahrungen aus dem Artis Royal Zoo, Amsterdam, neigen Kleinkantschile zur Ausbildung von Zahnwurzelabszessen, die meist, unter anderem aufgrund des geringen Behandlungsspielraumes, letal enden (persönliche Mitteilung M. Hoyer). Unter dem Aspekt dieser infausten Prognose wurde der Kleinkantschil tierschutzgerecht am Tag 125 *p.i.* euthanasiert. Die am Tag der Euthanasie durchgeführte Sektion (Kap. 4.2.1) bestätigte den Verdacht eines vom Zahnfach ausgehenden, abszedierenden Prozesses.

Abbildung 12 gibt den Verlauf der Rektaltemperatur vor und nach Superinfektion wider. Verglichen mit den *a.i.* bestimmten Rektaltemperaturen von $38,4 \pm 0,36^\circ\text{C}$ ($\bar{x} \pm s$) (x_{\min} $37,8^\circ\text{C}$, x_{\max} $39,2^\circ\text{C}$) waren die am 42. und 125. Tag *p.i.* mit $39,6^\circ\text{C}$ und $40,1^\circ\text{C}$ gemessenen Werte erhöht. Während für den ersten Anstieg keine durch untypische Umstände bedingte Erklärung vorliegt, liegt die Ursache für die erhöhte Rektaltemperatur am Tag der Euthanasie höchstwahrscheinlich in dem entzündlichen, vom Periodontium ausgehenden Prozess.

Eine tabellarische Übersicht über die Kenngrößen zur Lage und Streuung der Messwerte von Körpermasse und Rektaltemperatur findet sich im Anhang (Kap. 9.5).

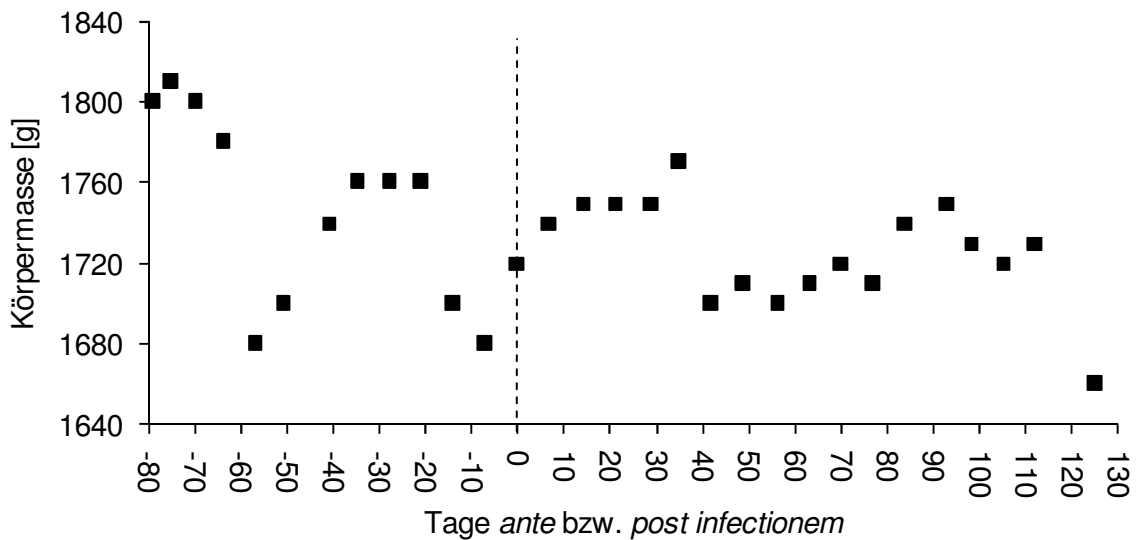


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Körpermasse (Tag 0 = Tag der experimentellen Infektion)

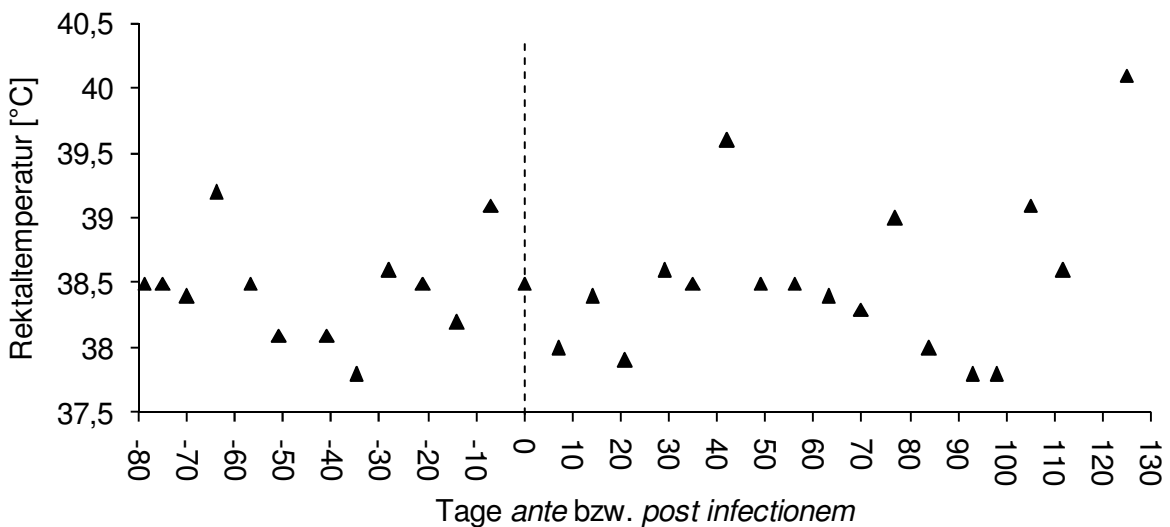


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Rektaltemperatur (Tag 0 = Tag der experimentellen Infektion)

4.1.2 Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung

Abbildung 13 gibt einen Überblick über den Verlauf der wöchentlich bestimmten Gesamtleukozytenzahl sowie der Anteile an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten vor und nach experimenteller Infektion. Kenngrößen zu Lage und Streuung der Messwerte finden sich in Kapitel 9.5.

Verglichen mit den *a.i.* bestimmten Gesamtleukozytenzahlen von $4 \pm 0,87$ G/l ($\bar{x} \pm s$) (x_{\min} 2,5 G/l, x_{\max} 5,2 G/l) zeigte sich 7 Tage *p.i.* zunächst eine Abnahme auf 3 G/l und 14 Tage *p.i.* ein Anstieg auf 6,54 G/l. Am 21. Tag *p.i.* sank die Gesamtleukozytenzahl wieder auf 3,01 G/l. Im weiteren Verlauf konnten an den Tagen 42 und 105 *p.i.* mit 5,52 G/l und 5,85 G/l ein geringfügiger Anstieg, an den Tagen 93 und 98 *p.i.* mit 2,85 bzw. 3,02 G/l eine geringfügige Abnahme der Leukozytenzahlen beobachtet werden. Am 125. Tag *p.i.* wurde ein deutlicher Anstieg der Gesamtleukozytenzahl auf 10,5 G/l festgestellt.

Vor experimenteller Infektion wurden absolute Lymphozytenzahlen von $3,34 \pm 0,84$ G/l ($\bar{x} \pm s$) (x_{\min} 2,05, x_{\max} 4,42 G/l) gemessen. Verglichen mit den *a.i.* erhobenen Werten zeigte sich an den Tagen 14 und 105 *p.i.* eine geringfügig erhöhte, 125 Tage *p.i.* mit 7,67 G/l dagegen eine deutlich erhöhte Zahl an Lymphozyten. Die absolute Zahl an neutrophilen Granulozyten bewegte sich *a.i.* im Bereich von $0,6 \pm 0,15$ G/l ($\bar{x} \pm s$) (x_{\min} 0,39, x_{\max} 0,88 G/l). Nach experimenteller Infektion wurden an den Tagen 14, 35, 42, 105 und 112 geringfügig erhöhte, am 93. Tag *p.i.* geringfügig erniedrigte Werte gemessen. Die am Tag 125 *p.i.* bestimmte Zahl an neutrophilen Granulozyten war mit 2,63 G/l dagegen deutlich erhöht.

Relativ betrachtet, war am 14. Tag *p.i.* der Anteil an Lymphozyten im Vergleich zum Zeitraum vor Superinfektion geringfügig erniedrigt, der Anteil an neutrophilen Granulozyten dagegen geringfügig erhöht. Ab dem 93. Tag *p.i.* nahm die relative Zahl an Lymphozyten anhaltend ab, während die der neutrophilen Granulozyten beständig zunahm. Am 125. Tag *p.i.* betrug der relative Anteil an Lymphozyten 73% und der neutrophiler Granulozyten 27%, wovon sich 2% ($\approx 0,21$ G/l) als jugendliche, stabkernige Neutrophile darstellten. Der Anteil eosinophiler Granulozyten am Differenzialblutbild bewegte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 0-5% (0-0,28 G/l); basophile Granulozyten und Monozyten konnten in den wöchentlich untersuchten Blutaussstrichen nicht beobachtet werden.

Die am Tag 125 *p.i.* ausgebildete Leukozytose, die vorausgehende relative Zunahme neutrophiler Granulozyten sowie die Kernlinksverschiebung sind höchstwahrscheinlich auf den entzündlichen, vom Periodontium ausgehenden Prozess zurückzuführen.

ERGEBNISSE

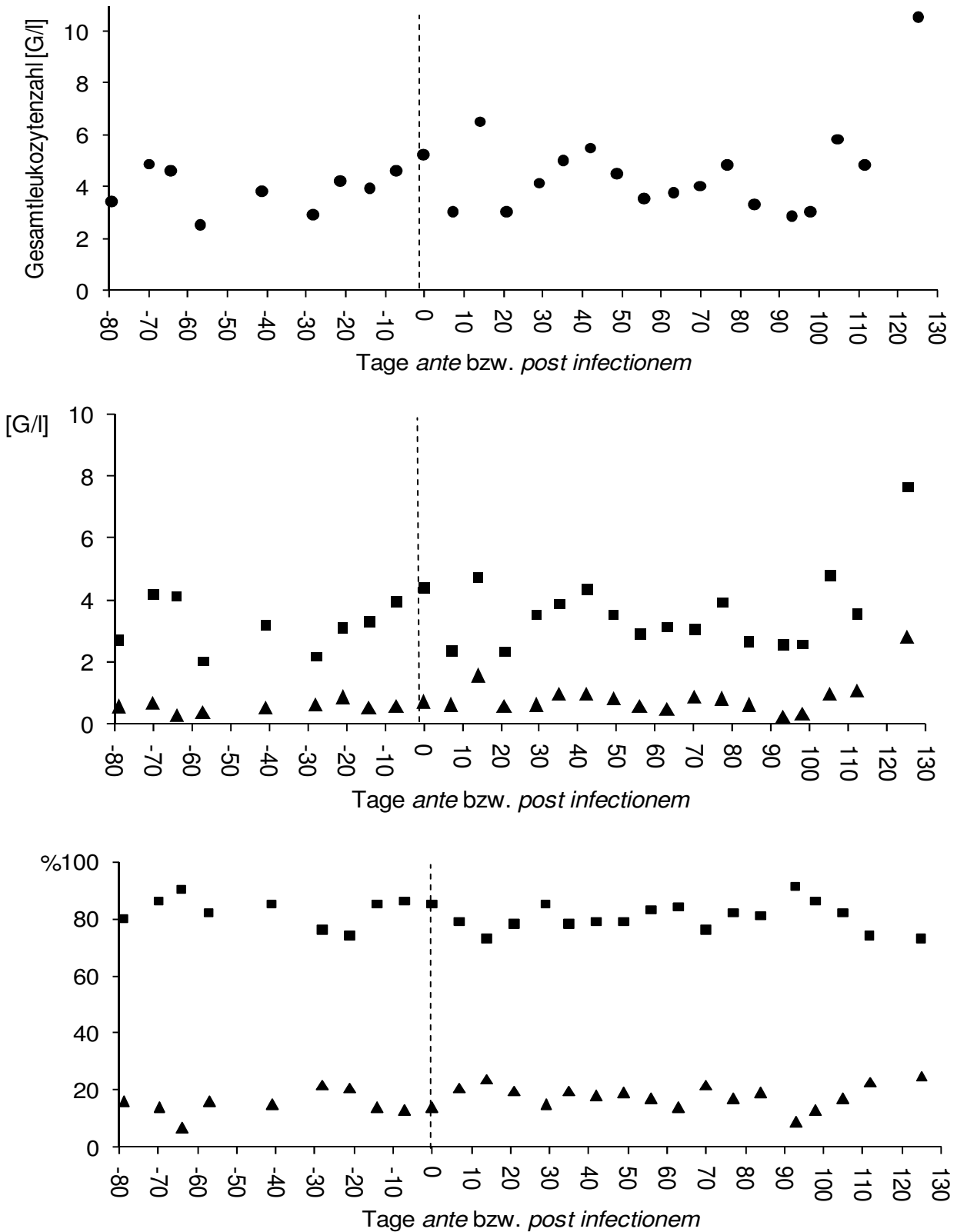


Abb. 13: zeitlicher Verlauf der Gesamtleukozytenzahl sowie absoluter und relativer Anteile von Lymphozyten (■) und neutrophilen Granulozyten (▲) (Tag 0 = Tag der experimentellen Infektion)

4.1.3 Ergebnisse der Virusneutralisationstests

Proben aus dem gesamten Beobachtungszeitraum wurden im VNT auf ihre neutralisierende Eigenschaft gegenüber dem zur experimentellen Infektion eingesetzten BVDV-Stamm SH9/11 sowie den Stämmen Grub 313/83 (Frölich, 1993) und NADL (Collett et al. 1988b und c) getestet. Während keine der vor experimenteller Infektion gewonnenen Proben neutralisierende Eigenschaften gegenüber den im VNT eingesetzten BVDV-Stämmen besaß (Tage 84 bis 7 *a.i.*), erwies sich die am Tag 21 *p.i.* entnommene Probe als fraglich positiv gegenüber dem zur experimentellen Infektion eingesetzten Stamm SH9/11. Der errechnete Titer lag bei 1:4. Die Probe von Tag 29 *p.i.* zeigte sich negativ. Die an den Tagen 35 und 42 *p.i.* entnommenen Proben erwiesen sich als sicher positiv gegenüber dem zur experimentellen Infektion eingesetzten Stamm SH9/11. Die errechneten Titer lagen bei 1:16 bzw. 1:9. Die Reaktion gegenüber den BVDV-Stämmen Grub 313/83 und NADL war zu jedem Zeitpunkt negativ.

4.1.4 Ergebnisse der kulturellen Virusisolierung und -vermehrung von Nasensekret- und Speichelproben

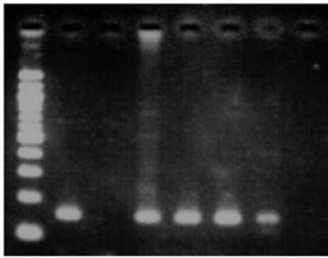
BFL-Zellkulturen wurden mit den aufgearbeiteten Nasensekret- und Speichelproben inokuliert. Bis zur dritten Passage wies keine der Zellkulturen einen zpE auf. Dennoch konnten in Zellen der zweiten Passage mittels RT-PCR BVDV bzw. beide beteiligten BVDV-Stämme PvMd und SH9/11 nachgewiesen werden (Kapitel 4.1.5 und 4.1.6).

4.1.5 Erfolgskontrolle zur Spezifität der eingesetzten Primer und Nachweis der BVDV-Stämme PvMd und SH9/11 in Leukozyten, Nasensekret, Speichel, Kot und Ejakulat

Die eingesetzten forward Primer PvMd-V und SH9/11-V wurden vor ihrem Einsatz an Proben des Versuchstieres aus dem Zeitraum vor experimenteller Infektion sowie an dem zur experimentellen Infektion verwendeten BVDV-Stamm SH9/11 auf ihre Spezifität getestet (Abb. 14). Das Primerpaar BVD3/PEST2 (Fischer et al., 1998) amplifizierte Virus aus allen eingesetzten Proben (Abb. 14 A). Das Primerpaar PvMd-V/PEST2 amplifizierte entsprechend der beabsichtigten Spezifität Virus aus allen eingesetzten Proben, nicht aber aus der Virussuspension des zur experimentellen Infektion verwendeten Stammes (Abb. 14 B), das Primerpaar SH-V/PEST2 nur aus der eingesetzten Virussuspension des BVDV-Stammes SH9/11 (Abb. 14 C). Die Spezifität der Primer konnte weiterhin durch Sequenzierung der einzelnen PCR-Produkte bestätigt werden.

ERGEBNISSE

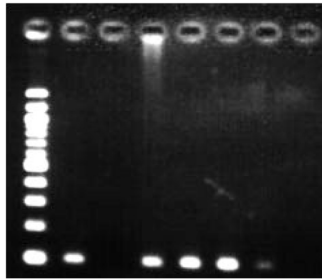
A: Primerpaar BVD3 / PEST 2
1 2 3 4 5 6 7 8



Laufspur

1 Längenstandard
2 Positivkontrolle: Stamm SH9/11
3 Negativkontrolle
4 Leukozytenzentrifugat
5 Nasensekret
6 Speichel
7 Kot
8 -

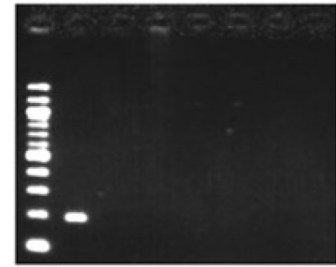
B: Primerpaar PvMd-V / PEST 2
1 2 3 4 5 6 7 8



Laufspur

1 Längenstandard
2 Positivkontrolle : Nasensekret
3 Negativkontrolle
4 Leukozytenzentrifugat
5 Nasensekret
6 Speichel
7 Kot
8 Isolat SH9/11

C: Primerpaar SH-V / PEST2
1 2 3 4 5 6 7 8



Laufspur

1 Längenstandard
2 Positivkontrolle: Stamm SH9/11
3 Negativkontrolle
4 Leukozytenzentrifugat
5 Nasensekret
6 Speichel
7 Kot
8 -

Abb. 14: Kontrolle zur Spezifität der entwickelten Primer SH9/11-V und PvMd-V

Die gewonnenen Leukozyten-, Nasensekret-, Speichel-, Kot- und Ejakulatproben wurden mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von BVDV und spezifisch auf das Vorkommen der beteiligten BVDV-Stämme, des persistierenden PvMd und des experimentell inokulierten SH9/11 getestet. Isolierte Leukozyten, Kot- und Ejakulatproben kamen dabei direkt zur Verwendung, Nasensekret- und Speichelproben nach Virusvermehrung in BFL-Zellkulturen.

Das persistierende nzp PvMd wurde kontinuierlich in allen untersuchten Leukozytenpellets von Tag 41 *a.i.* bis Tag 125 *p.i.* detektiert. Im Nasensekret des Versuchstieres wurde es an den Tagen 41, 35, 28, 21 und 7 *a.i.* sowie 7, 14, 21, 29, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 84, 93, 98, 112 und 125 *p.i.* festgestellt, im Speichel an den Tagen 41, 35, 28, 14 und 21 *a.i.* sowie 7, 21, 29, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 98, 105, 112 und 125 *p.i.* Kotproben des Versuchstieres zeigten sich an den Tagen 41, 35, 28, 21 und 7 *a.i.* sowie 7, 29, 35, 42, 49, 63, 70, 77, 84, 93, 98, 105, 119 und 125 *p.i.* positiv gegenüber dem persistierenden Virus (Tab. 5).

Das inokulierte zp BVDV konnte erstmals am Tag 29 *p.i.* in Leukozyten und Kot nachgewiesen werden. Am Tag 35 *p.i.* wurde es nur in der Kotprobe detektiert. Am Tag 70 *p.i.* wurde es im Speichel des Versuchstieres nachgewiesen und 14 Tage später (Tag 84 *p.i.*) in dessen Nasensekret. An den Tagen 105, 112 sowie 125 *p.i.* konnte es wiederum im Speichel detektiert werden (Tab. 5). Sequenzierung und Vergleich der einzelnen, mit dem Primerpaar SH-V/PEST2 positiv reagierenden PCR-Produkte bestätigten diese Ergebnisse.

Das an den Tagen 7 und 125 *p.i.* entnommene Ejakulat erwies sich gegenüber dem persistierenden nzp Virus PvMd positiv, gegenüber dem inokulierten zp BVDV dagegen negativ (Tab. 5).

ERGEBNISSE

Alle Probenmaterialien, die mit den spezifischen Primerpaaren PvMd-V/PEST2 und /oder SH9-V/PEST2 positive Ergebnisse erbrachten, reagierten auch mit dem Pestivirus-Primerpaar BVD3 / PEST2 positiv (Tab. 5).

Tab. 5: Reaktion der Probenmaterialien Leukozyten, Nasensekret, Speichel, Kot und Ejakulat bei Einsatz der Primerpaare BVD3 / PEST2 (**A**), PvMd-V / PEST2 (**B**) und SH-V / PEST2 (**C**) in der RT-PCR *ante* (Tage -41 bis 0) und *post infectionem* (Tage 7 bis 125); +: positiv, -: negativ, /: nicht getestet; Tag 0: Tag der experimentellen Infektion

| Tag | Leukozyten | | | Nasensekret | | | Speichel | | | Kot | | | Ejakulat | | |
|------|------------|---|---|-------------|---|---|----------|---|---|-----|---|---|----------|---|---|
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| - 41 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | / | / | / |
| - 35 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | / | / | / |
| - 28 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | / | / | / |
| - 21 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | / | / | / |
| - 14 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - | / | / | / |
| - 7 | + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | / | / | / |
| 0 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 7 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - |
| 14 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - | / | / | / |
| 21 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - | / | / | / |
| 29 | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | / | / | / |
| 35 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | + | / | / | / |
| 42 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | / | / | / |
| 49 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | / | / | / |
| 56 | / | / | / | + | + | - | + | + | - | - | - | - | / | / | / |
| 63 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | / | / | / |
| 70 | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | / | / | / |
| 77 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | / | / | / |
| 84 | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - | / | / | / |
| 93 | + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | / | / | / |
| 98 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | / | / | / |
| 105 | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | / | / | / |
| 112 | + | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | / | / | / |
| 119 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | + | + | - | / | / | / |
| 125 | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + | - |

4.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse *ante mortem*

Abbildung 15 gibt eine zusammenfassende Übersicht der in den bisherigen Kapiteln beschriebenen klinischen und hämatologischen Befunde und stellt diese dem Nachweis der BVDV-Stämme PvMd und SH9/11 in Blut und Ausscheidungen des Tieres gegenüber.



Abb. 15: Gegenüberstellung der Ergebnisse *ante mortem*
(Tag 0: Tag der experimentellen Superinfektion, Tag 125: Tag der Euthanasie)

4.2 Ergebnisse der Untersuchungen *post mortem*

4.2.1 Ergebnisse der pathologischen Untersuchung

Makroskopische Befunde

Bei der unmittelbar nach Eintritt des Todes durchgeführten Obduktion stellte sich der Kleinkantschil abgesehen von dem arttypisch hageren Körperbau bei einer Körpermasse von 1660 g in mäßigem Ernährungszustand dar.

Die äußere Besichtigung des Tierkörpers bestätigte den klinischen Verdacht eines vom Zahnfach ausgehenden, abszedierenden Prozesses: der verbliebene Stumpf des 28 Tage *a.i.* frakturierten rechten oberen Eckzahns zeigte sich gelockert, der Zahnhalteapparat dunkelrot und schwammartig verdickt, angrenzende Knochenstrukturen erschienen palpatorisch stellenweise aufgelöst. Eine mit reichlichem, gelbem, pastösen Material gefüllte Abszesshöhle erstreckte sich von der Wurzel des rechten Kaninus ausgehend über Nasenbein und Oberkiefer bis hin zum Stirnbein. Die den Prozess bedeckende Haut war trocken und dünn, das Haarkleid in diesem Bereich stumpf und abgebrochen. Nach Absetzen des Kopfes und paramedianem Sagittalschnitt wurden in den Nasen- und Nasennebenhöhlen mittelgradig gerötete, am Siebbein grünlich verfärbte Schleimhäute vorgefunden.

In der Maulhöhle zeigten sich geringgradige, gelb-braune Niederschläge an Prämolaren und Molaren sowie eine geringgradige Rotfärbung des Zahnfleischsaumes; die übrige Maulschleimhaut sowie das Epithel der Zunge waren glatt und unversehrt.

An der Körperoberfläche fiel über dem Brustbein ein ca. 1,5 x 4 cm großer Bereich auf, in dem die Haut derb, verdickt und haarlos war (Liegeschwiele). Die Haut der übrigen Körperoberfläche, inklusive der Zwischenzehenhaut, des Kronsaums und des Hodensacks, war intakt, das übrige Haarkleid vollständig und dicht anliegend. Auch Augen, Gehörgänge, After und Präputium zeigten keine Veränderungen und waren sauber und trocken.

Nach Entfernen der Haut trat ein hellrosa-farbenes, feuchtes Unterhautgewebe mit spärlichen Fetteinlagerungen zutage. Die Muskulatur war symmetrisch ausgebildet, hellrot-braun und von glatten weißlichen Faszien bedeckt. Dorsal, in einem von der Thorakal- bis zur Lumbalregion reichenden Gebiet, zeigte sich das für adulte männliche Individuen arttypische Rückenschild. Das Skelett war symmetrisch und normal proportioniert, die Knochen gut mineralisiert und weißlich. Von den Körperlymphknoten stellten sich allein die Lnn. cervicales superficiales verändert dar. Sie waren beidseits etwa bohngroß, prallelastisch und von grau-roter Farbe, die Schnittflächen erschienen feucht und quollen hervor, Mark- und Rindenzone waren klar zu unterscheiden.

Die Organe der Bauch- und Beckenhöhle wurden in anatomisch normalen Lage- und Größenverhältnissen vorgefunden und entsprachen den tierartlichen Besonderheiten. Das Peritoneum war allseits transparent, feucht, glatt und glänzend. Bei der Untersuchung der einzelnen Organe und ihrer jeweiligen Lymphknoten konnte allein an der Milz eine Veränderung, eine Abrundung der Ränder festgestellt werden. Die Oberfläche war glatt und

dunkelviolett, das Organ insgesamt weichelastisch. Beim Anschneiden floss reichlich Blut ab, die Schnittfläche erschien feingranuliert und quoll mäßig hervor. Ebenso wie die Organe der Bauch- und Beckenhöhle wurden die Organe und Lymphzentren der Brusthöhle in ihren anatomisch normalen Lage- und Größenverhältnissen vorgefunden. Die Lungen erschienen beidseits rosarot, wenig retrahiert und von leicht teigiger Konsistenz. Von der Schnittfläche flossen geringe Mengen einer wässrigen, feinschaumigen Flüssigkeit ab, die auch in Bronchien und Trachea festgestellt werden konnte.

Mikroskopische Befunde

Die lichtmikroskopische Untersuchung HE-gefärbter Präparate zeigte im Bereich des von der Wurzel des rechten Kaninus ausgehenden und sich bis zum Stirnbein erstreckenden abszedierenden Prozesses hochgradig chronisch-aktives Granulationsgewebe mit multifokaler eitriger Osteolyse (Abb. 16).

Der aufgearbeitete rechte Ln. cervicalis superficialis wies bei der mikroskopischen Untersuchung eine gering- bis mittelgradige follikuläre Hyperplasie auf, das Keimzentrum zeigte sich geringgradig reaktiv, mittelgradig infiltriert von neutrophilen Granulozyten und wies eine mittelgradige, medulläre Plasmozytose auf (Abb. 18). Die Milz erschien diffus gestaut, die rote Pulpa mittelgradig infiltriert von neutrophilen Granulozyten. Die Lymphfollikel waren reaktionslos (Abb. 17).

In der Lunge fanden sich in den Alveolen sowie, wenn auch geringgradiger, im Interstitium proteinreiche Flüssigkeitsansammlungen sowie vereinzelte intraalveoläre Hämorrhagien.

Die Leber zeigte bei intakter mikroskopischer Anatomie, multifokal in einzelnen Leber- und Kupffer' Zellen helle, gelbliche bis grün-braune, granuläre Ablagerungen. Sowohl die Berliner Blau-Reaktion zum Nachweis einer Eisenspeicherung als auch die modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung zur Darstellung von Lipofuszin verliefen negativ.

Die histologische Untersuchung des Verdauungstraktes ergab eine oberflächliche bakterielle Besiedlung des intakten Speiseröhren- und Pansenepithels mit am Epithel haftenden, feinsten Kokken, die in der Speiseröhre noch geringgradig erschienen, sich im Pansen massiv verstärkte und dort zudem mit Protozoen der Pansenflora durchmischt war. Die Betrachtung der Schleimhaut lieferte keinen Hinweis auf eine Infiltration mit Entzündungszellen. Im Labmagen fanden sich in den Lumina der oberflächlichen Drüsenschläuche lange, fädige Bakterien. Im Leerdarm konnte bei intaktem Schleimhautepithel eine geringgradige Infiltration des Schleimhautbindegewebes mit neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. Die mukosa-assoziierten, lymphatischen Gewebe waren nicht verändert.

In beiden Nieren zeigten sich im Bereich der Nierenkörperchen eine gering- bis mittelgradige Infiltration durch neutrophile Granulozyten, Ansammlung proteinreicher Flüssigkeit in den Bowmanschen Kapseln sowie eine geringgradige Schwellung und Proliferation von Endothel-, Epithel- und Mesangiumzellen (Abb. 19).

Kein weiteres lichtmikroskopisch untersuchtes Organ des Atmungs- (Nase, Nasenspiegel, Nasennebenhöhlen, Larynx), Verdauungs- (Lippen, Zunge, weicher Gaumen, Ohrspeicheldrüse, Speiseröhre, Pankreas, Duodenum, Ileum, Kolon) oder Urogenitaltraktes

(Harnblase, Penis), der Augen (Lider, Tränendrüse, Konjunktiva, Linse, Glaskörper, Uvea, Retina), des Zentralnervensystems (Gehirn, Hirnhäute, Rückenmark), des Bewegungsapparates (Os femoris und M. quadriceps femoris) oder der äußeren Haut (auch Intermandibulardrüse und Präputium) zeigte pathomorphologische Veränderungen.

Zur Vollständigkeit wurde eine mikrobiologische Untersuchung von Milz, Leber, Lunge und Darm eingeleitet (durchgeführt durch Dr. S. Speck, Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung): das Lungengewebe zeigte sich geringgradig mit *Enterococcus spp.* kontaminiert, die Leber zeigte eine unspezifische Mischflora, im Darm wurden geringgradige Gehalte einer unspezifischen Mischflora sowie Spuren von *Clostridium perfringens* nachgewiesen. In der Milz war kein Keimgehalt nachweisbar.

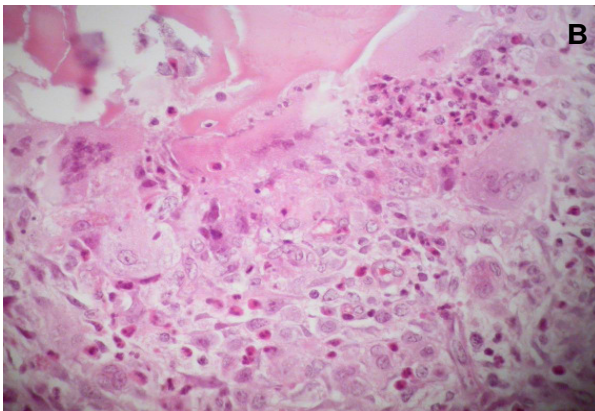
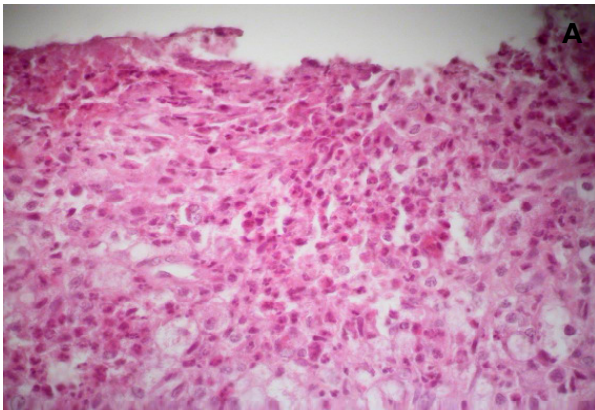


Abb. 16: chronisch-aktives Granulationsgewebe (A) und multifokale Osteolyse (B) im Bereich der Abszessbildung im Oberkiefer; HE, A x 40, B x 40

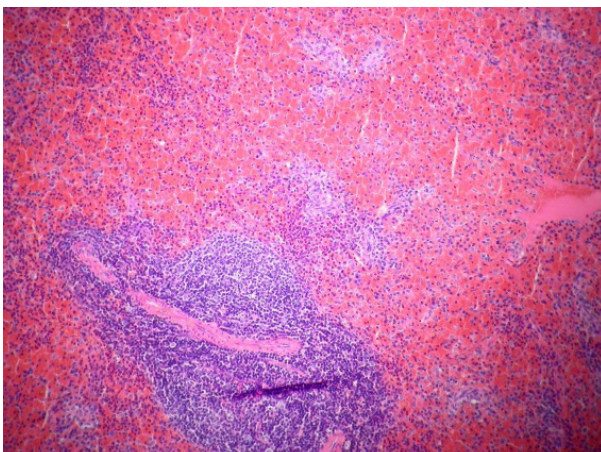


Abb. 17: Kongestion und geringgradige, entzündliche Infiltration der Milz; HE, x 10

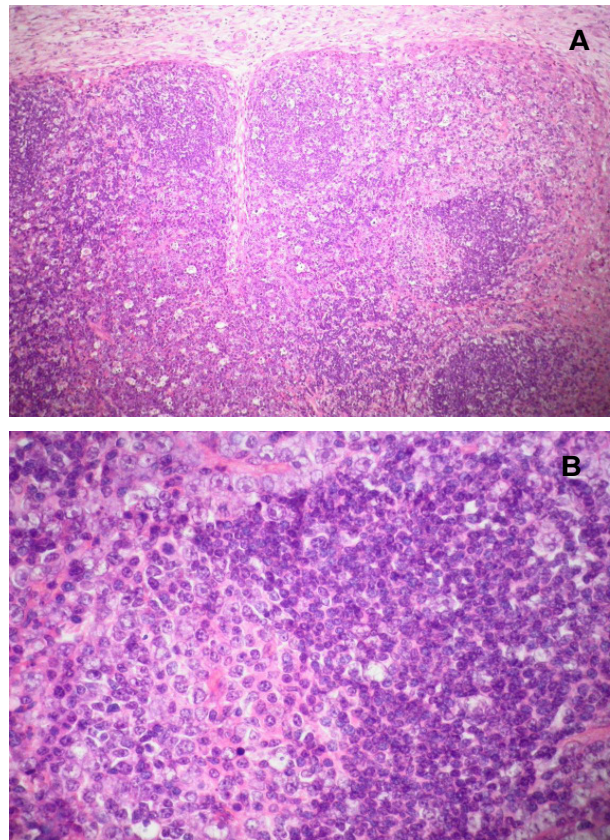


Abb. 18: folliculäre Hyperplasie (A) und medulläre Plasmozytose (B) des rechten Ln. cervicalis superficialis; HE, A x 10, B x 40

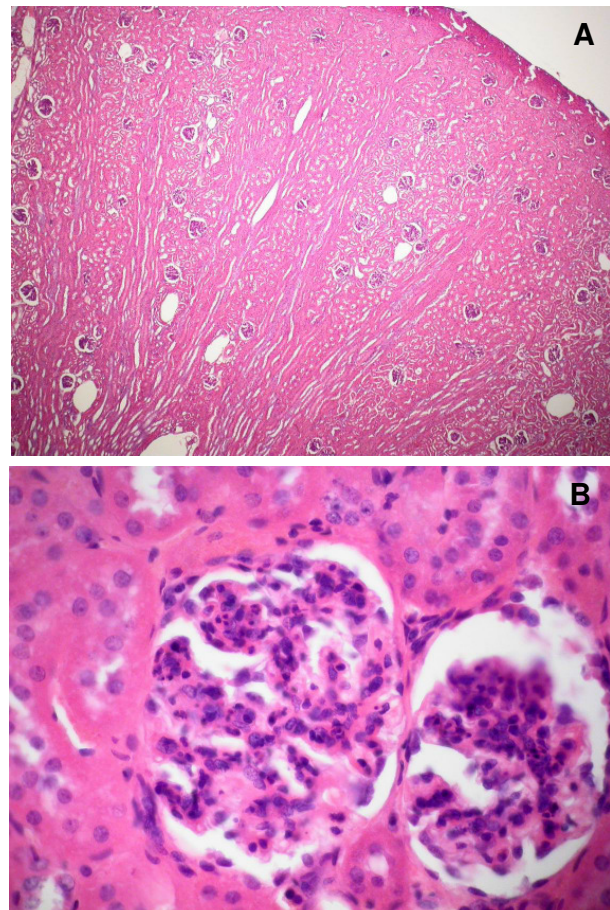


Abb. 19: Nierenrinde (A) und Nierenkörperchen (B) mit entzündlicher Infiltration, Exsudation sowie Schwellung und Proliferation glomerulärer Zellen; HE, A x 4, B x 40

Zusammenfassend ließen sich folgende Diagnosen stellen:

- chronische, abszedierende Periodontitis des rechten, oberen Kaninus mit nachfolgender, lokal variierender, katarrhalisch bis purulenter Rhinitis und Sinusitis sowie multifokaler, progressiver, nekrotisierender, lytischer (Pan-) Ostitis der Ossa nasale, maxillare und frontale sowie des Os ethmoidale
- akute Lymphadenitis simplex der Lnn. cervicales superficiales
- diffuse, gering- bis mittelgradige mesangioproliferative Glomerulonephritis mit geringgradiger Proteinurie
- akutes alveoläres und interstitielles Lungenödem mit intraalveolären Hämorrhagien
- akute kongestive Splenomegalie mit geringgradiger entzündlicher Infiltration der Pulpa rubra
- erworbene Hepatose mit geringgradiger Ablagerung von Gallenfarbstoff
- mittelgradiger Cremor dentis an Prämolaren und Molaren
- geringgradige chronische katarrhalische Gingivitis
- mittelgradige sternale Proliferationshyperkeratose mit Ausbildung eines Tylomas

4.2.2 Ergebnisse der kulturellen Virusisolierung und -vermehrung von Organproben

BFL-Zellkulturen wurden mit den aufgearbeiteten Sektionsproben von Nasen- und Maulschleimhaut, Zunge, Speicheldrüse, Speiseröhre, Pansen, Labmagen, Milz, Niere, Hoden und rechtem Ln. cervicalis superficialis inokuliert. Keine der Zellkulturen wies bis zur dritten und letzten Passage zpE auf. Dennoch konnte in verschiedenen Proben der zweiten Passage mittels RT-PCR BVDV sowie die beteiligten BVDV-Stämme PvMd und/oder SH9/11 nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.3).

4.2.3 Nachweis der beteiligten BVDV-Stämme in Organen und Geweben

Organe und Gewebe wurden mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von BVDV und spezifisch auf das Vorkommen der beteiligten Viren PvMd und SH9/11 getestet. Alle beprobten Organe ergaben positive Ergebnisse mit dem Primerpaar BVD3 / PEST 2. Ebenso konnte das persistierende nzp BVDV PvMd in allen Proben des Verdauungstraktes, des Atmungstraktes, des Harn- und Geschlechtsapparates, der lymphatischen Organe, der Haut- und Hautanhangsorgane, in Strukturen des Auges, in der Muskulatur sowie im Zentralnervensystem detektiert werden. Ohrspeicheldrüse, Ln. cervicalis superficialis, Pansen, Labmagen und Niere zeigten sich darüber hinaus positiv gegenüber dem experimentell inokulierten zp BVDV. Sequenzierung und Vergleich der einzelnen, mit Primerpaar SH9/11-V/PEST2 positiv reagierenden PCR-Produkte bestätigten diese Ergebnisse.

Eine Darstellung der Ergebnisse gibt Abbildung 20, eine tabellarische Übersicht über die beprobten Organe und die jeweiligen Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.2.5.

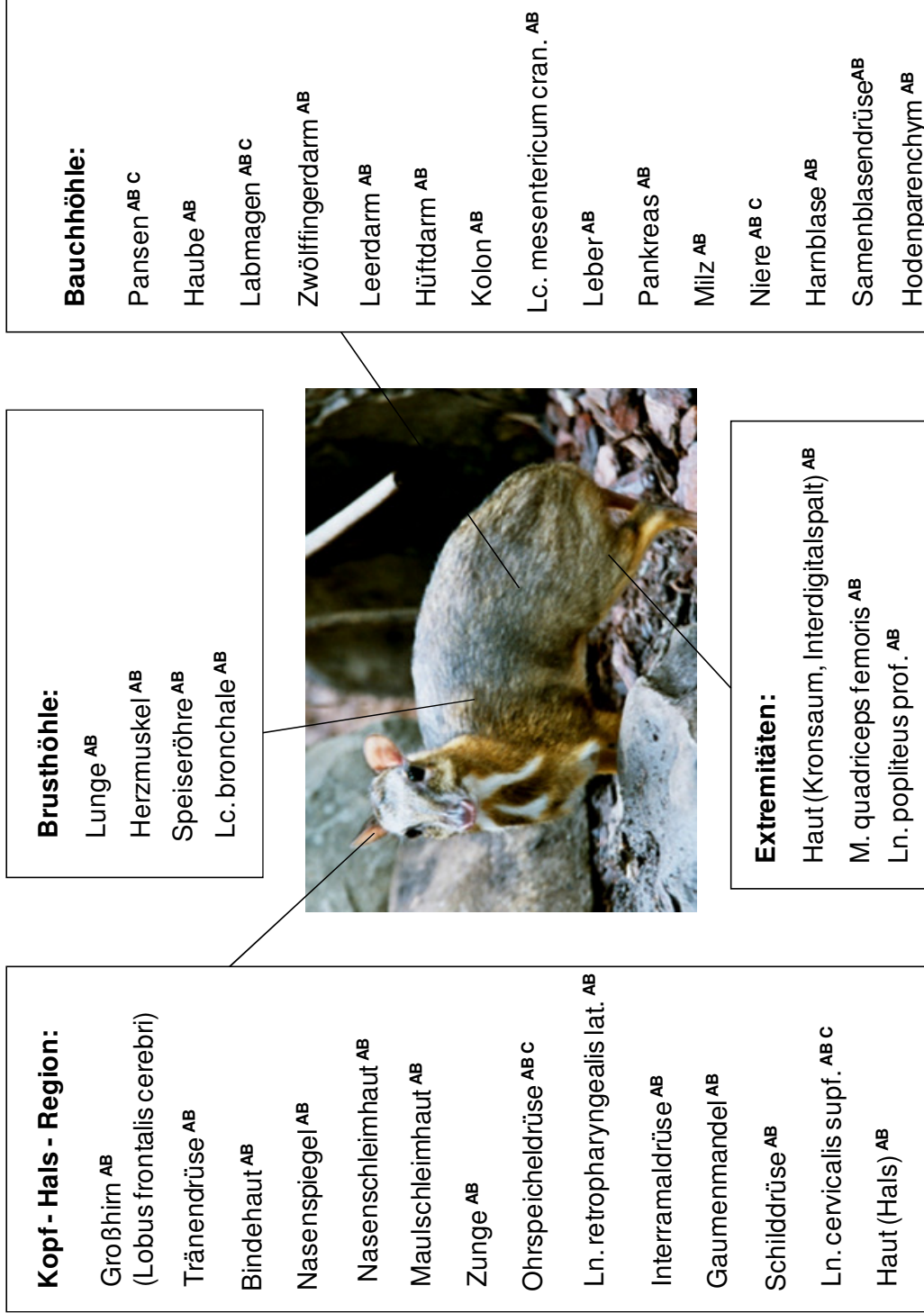


Abb. 20: Übersicht zum Nachweis der beteiligten BVDV-Stämme PvMd und SH9/11 in Organen und Geweben; A: positive Reaktion in der RT-PCR mit dem Primerpaar BVD3/PEST2; B: positive Reaktion in der RT-PCR mit dem Primerpaar PvMd-V/PEST2; C: positive Reaktion in der RT-PCR mit dem Primerpaar SH-V/PEST

4.2.4 Darstellung von BVDV-Antigen in Organen und Geweben

Bei der immunhistochemischen Untersuchung auf BVDV-Antigen konnte sowohl an Gefrierschnitten als auch an formalinfixierten, in Paraffin eingebetten Organproben Virusantigen nachgewiesen werden. Positiv mit unterschiedlicher Färbeintensität verlief der Antigennachweis an Strukturen des Verdauungsapparats, des Harntrakts, der Haut- und Hautanhangsorgane, der lymphatischen Organe und des Zentralnervensystems. Das BVDV-Antigen zeigte im Zytoplasma verschiedener Zelltypen ein feingranuläres Reaktionsmuster. Zellkerne verblieben negativ und erschienen wie andere saure Bestandteile der Zelle durch die Hintergrundfärbung violett.

Von den Organen des Verdauungstraktes wurden Präparate von Zunge und Hüft darm an Gefrierschnitten, Präparate von Flotzmaul, Zunge, Ohrspeicheldrüse, Speiseröhre, Pansen, Haube, Labmagen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon sowie der Leber an Paraffinschnitten getestet. Positiv verlief der BVDV-Antigen-Nachweis in Flotzmaul, Zunge, Ohrspeicheldrüse, Pansen, Haube, Labmagen sowie im Hüft darm.

Am Paraffinpräparat der Ohrspeicheldrüse konnte Virusantigen nach Reaktion mit dem mAk 15c5 mit schwacher Färbeintensität multifokal im Zytoplasma seröser Endstückzellen nachgewiesen werden (Abb. 21).

Am Flotzmaul zeigten sich bei Anwendung des mAk 15c5 multifokal einzelne Basalzellen des Plattenepithels schwach positiv.

In der Zunge reagierten am Gefrierschnitt verstreut vor allem Zellen der Basalzellschicht des Plattenepithels, aber auch Fibrozyten und Gefäßendothelien des bindegewebigen Papillarkörpers und der Muskulatur mit den mAk Ca4/34-42 und C16 schwach bis moderat positiv (Abb. 22). Negativ verlief der BVDV-Antigen-Nachweis am Paraffinschnitt der Zunge.

Im Pansen zeigte sich Virusantigen nach Reaktion mit dem mAk 15c5 multifokal und mit mittlerer Positivität in Basalzellen des Schleimhautepithels einzelner Pansenzotten, weniger in Fibrozyten des Schleimhautbindegewebes. Ein ähnliches Bild ergab die immunhistochemische Untersuchung der Haube: multifokal wiesen Basalzellen des Schleimhautepithels schwach positive Reaktionen auf. Im Gegensatz zum Pansen, konnte in den Fibrozyten des Schleimhautbindegewebes der Haubenleisten kein Virusantigen festgestellt werden. Im Labmagen erwiesen sich einzelne epitheliale Zellen der Schleimhaut als positiv.

Im Darm konnte nur am Gefrierschnitt des Hüft darms Virusantigen nachgewiesen werden: einzelne Enterozyten zeigten am Gefrierschnitt schwach positive Reaktionen mit den mAk Ca4/34-42. An Präparaten von Duodenum, Jejunum, Kolon sowie der Leber verlief der Antigennachweis negativ.

Stellvertretend für den Harntrakt wurden Paraffinpräparate der Niere auf das Vorhandensein von BVDV-Antigen überprüft. Vor allem im Markbereich zeigten sich multifokal Epithelzellen des Tubulussystems bei Einsatz des mAk 15c5 stark positiv (Abb. 23a und b).

Vom Zentralnervensystem wurden zunächst Gefrierpräparate eines Längsschnitts des Lobus frontalis cerebri sowie des Zerebellums untersucht. Weder mit dem mAk Ca3/34-42 noch mit

dem mAk C16 wurde BVDV-Antigen nachgewiesen. In, das Großhirn im Längsschnitt vom Lobus occipitalis bis zur Hippocampusformation sowie das Zerebellum zeigenden Paraffinpräparaten dagegen, erwiesen sich sowohl Kleinhirn- als auch Großhirnrinde (Abb. 24) und vor allem das Ammonshorn als positiv für das Vorkommen von BVDV-Antigen. Betroffen waren vor allem Perikarya der Neurone der Rindenschichten, weniger Nervenzellfortsätze und Gefäßendothelien. Keine Reaktion zeigten die Gliazellen.

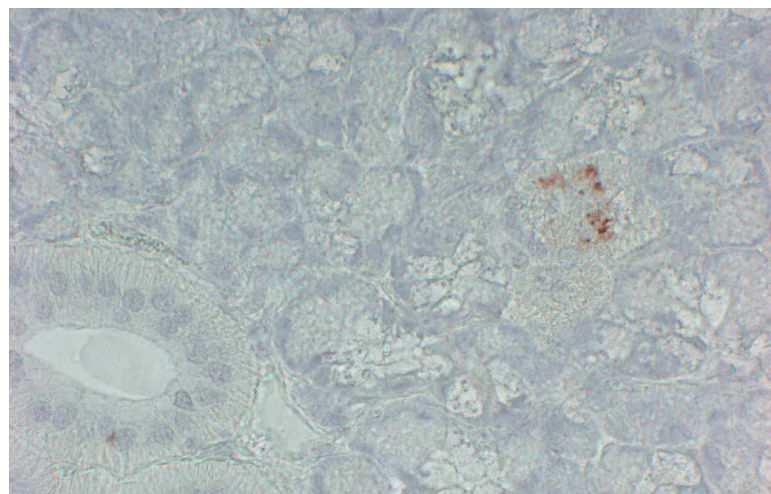
In Gefrierschnitten von Hautproben konnte BVDV-Antigen bei Einsatz des mAk Ca3/34-42 nachgewiesen werden. Multifokal zeigten sich Basalzellen des Plattenepithels, epitheliale Zellen der Haarfollikel und angrenzender Schweißdrüsen sowie Gefäßendothelien eine schwache bis mittlere Positivität (Abb. 25). Negativ verlief der Antigennachweis dagegen am Paraffinpräparat der Interramaldrüse, die stellvertretend für Hautdrüsen auf das Vorkommen von BVDV-Antigen untersucht wurde.

Von den Organen des Immunsystems wurden zunächst Gefrierpräparaten von Milz (Abb. 27), Gaumenmandel und Ln. retropharyngealis lateralis auf das Vorkommen von BVDV-Antigen untersucht. Der Nachweis gelang mit schwacher bis mittlerer Positivität in allen drei Organen. Positiv zeigten sich in erster Linie Lymphozyten, aber auch Retikulumzellen und deren Fortsätze sowie Gefäßendothelien. Negativ verlief der Antigennachweis dagegen am Paraffinpräparat der Milz sowie des rechten Ln. cervicalis superficialis.

Mit negativem Ergebnis verlief der Antigennachweis an Paraffinpräparaten der Augen (untersucht wurden Tränendrüse und drittes Augenlid), der Lunge, des Herzens, der Skelettmuskulatur (zur Untersuchung gelangte eine Probe des M. quadriceps femoris) sowie der Schilddrüse.

Eine tabellarische Übersicht über die beprobten Organe und die jeweiligen Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.2.5

Abb. 21: Immunhistologischer Nachweis von BVDV-Antigen in Endstückzellen der Ohrspeicheldrüse; Paraffinschnitt, mAk 15c5, 40 x



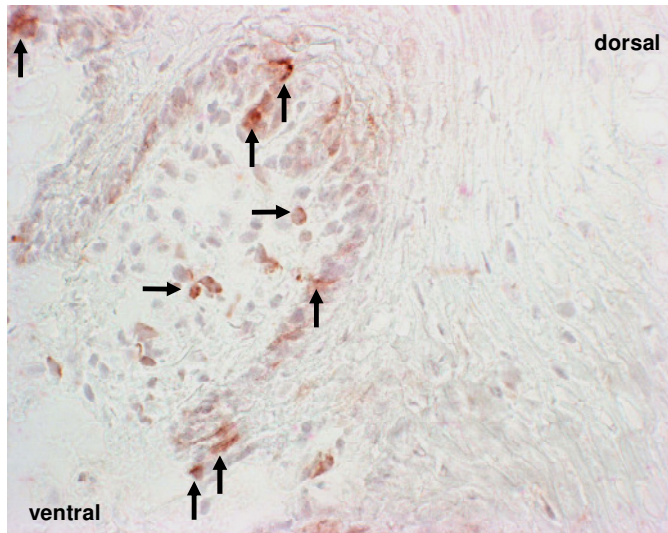


Abb. 22: Immunhistologischer Nachweis von BVDV-Antigen in der Zunge; vertikale Pfeile: positive Basalzellen, horizontale Pfeile: positive Fibrozyten; Gefrierschnitt, mAk Ca3/34-42, 40 x

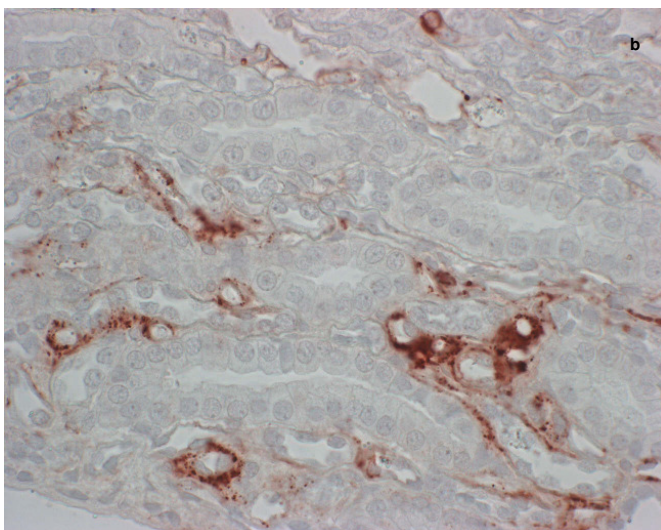
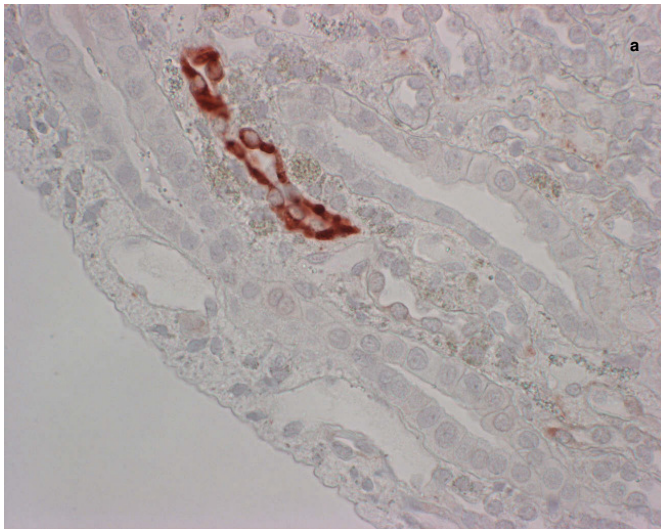


Abb. 23 a und b: Immunhistologischer Nachweis von BVDV-Antigen in epithelialen Zellen des renalen Tubulussystems; Paraffinschnitte, mAk 15c5, 40 x

Abb. 24: Immunhistologischer Nachweis von BVDV-Antigen in der äusseren Körnerschicht der Grosshirnrinde; vertikale Pfeile: positive Perikarya, horizontaler Pfeil: positive Dendriten; Paraffinschnitt, mAk 15c5, 40 x

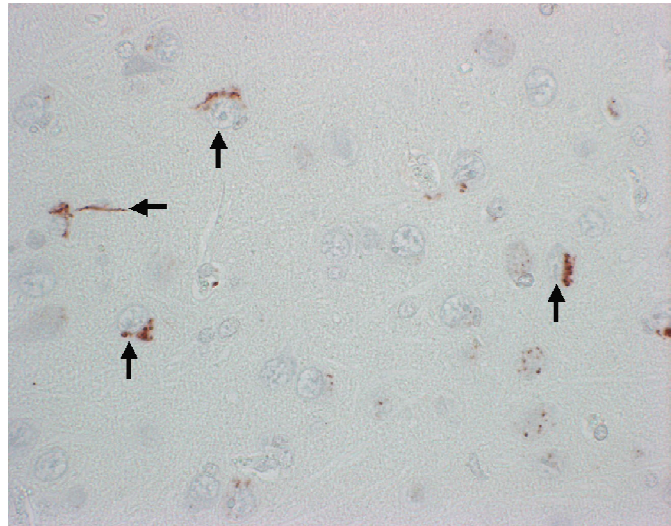


Abb.25: Immunhistologische Darstellung von BVDV-Antigenen in Epithelzellen eines Haarfollikels (horizontaler Pfeil) und Schweißdrüsen (vertikale Pfeile) der Haut; Gefrierschnitt, mAk Ca3/34-42, 40 x

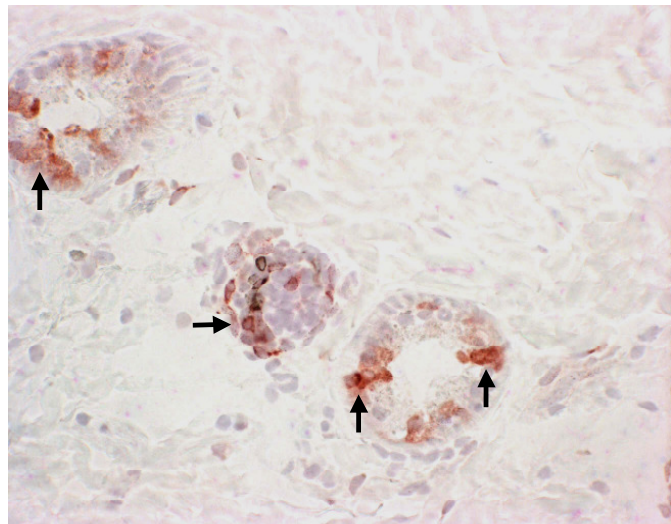
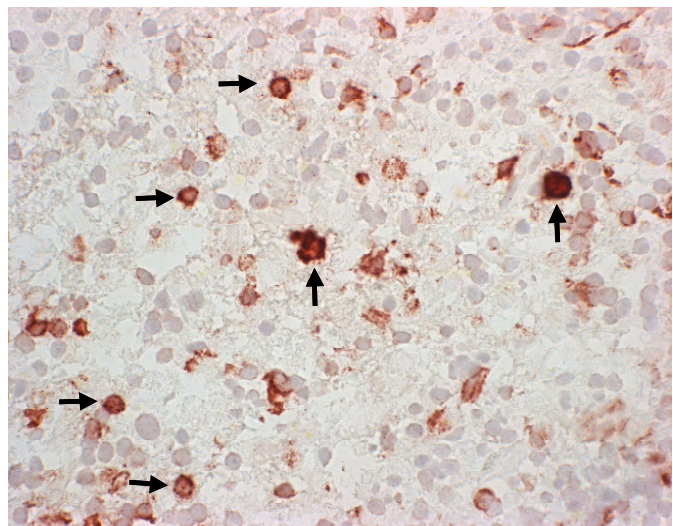


Abb. 26: Immunhistologische Darstellung von BVDV-Antigenen in der Milz; horizontale Pfeile: positive Lymphozyten, vertikale Pfeile: positive Makrophagen; Gefrierschnitt, mAk C16, 40 x



4.2.5 Tabellarische Übersicht über die Ergebnisse der virologischen und immunhistochemischen Untersuchungen *post mortem*

Im Folgenden seien die Ergebnisse der virologischen und immunhistochemischen Untersuchungen *post mortem* einander tabellarisch gegenübergestellt.

Tab. 6: Übersicht über die Ergebnisse der virologischen und immunhistochemischen Untersuchungen *post mortem*; in den Spalten 2 bis 4 finden sich die Ergebnisse der Untersuchung mittels RT-PCR, in den Spalten 5 bis 8 die des Antigennachweises mittels Immunhistochemie

| Probe | Virusnachweis mittels RT-PCR | | | Immunhistochemischer Antigennachweis | | | |
|-------|--|-------------------|-----------------|--|------------|------------|-------------|
| | + positiv; - negativ; / nicht getestet | | | + geringe, ++ mittlere, +++ starke Positivität; - negativ; / nicht getestet | | | |
| | BVD3 / PEST2 | PvMd-V / PEST2 | SH-V / PEST2 | mAk Ca3/34- 42 | mAk C16 | mAk C42 | mAk 15c5 |

Auge

Tunica conjunctiva

+ + - / / / /

Gl. lacrimalis

+ + - / / - -

Palpebra III

/ / / / / - -

Respirationstrakt

Tunica mucosa cavum nasi

+ + - / / / /

Pulmo

+ + - / / - -

Gastrointestinaltrakt

Tunica mucosa cavum oris

+ + - / / / /

Lingua

+ + - + - ++ ++ - -

Gl. parotis

+ + + / / - +

Oesophagus

+ + - / / - -

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tab. 6:

| Probe | Virusnachweis mittels RT-PCR | | | Immunhistochemischer Antigennachweis | | | |
|------------------------|--|-------------------|-----------------|--|------------|------------|-------------|
| | + positiv; - negativ; / nicht getestet | | | + geringe, ++ mittlere, +++ starke Positivität; - negativ; / nicht getestet | | | |
| | BVD3 / PEST2 | PvMd-V / PEST2 | SH-V / PEST2 | mAk Ca3/34- 42 | mAk C16 | mAk C42 | mAk 15c5 |
| Rumen | + | + | + | / | / | - | + - ++ |
| Reticulum | + | + | - | / | / | - | + |
| Abomasum | + | + | + | / | / | - | + |
| Duodenum | + | + | - | / | / | - | - |
| Jejunum | + | + | - | / | / | - | - |
| Ileum | + | + | - | + | + | - | - |
| Colon | + | + | - | / | / | - | - |
| Pancreas | + | + | - | / | / | / | / |
| Hepar | + | + | - | / | / | - | - |
| Urogenitaltrakt | | | | | | | |
| Ren | + | + | + | / | / | - | +++ - ++++ |
| Vesica urinaria | + | + | - | / | / | / | / |
| Gl. vesicularis | + | + | - | / | / | / | / |
| Testis | + | + | - | / | / | / | / |
| Endokrinium | | | | | | | |
| Gl. thyroidea | + | + | - | / | / | - | - |
| Gl. suprarenalis | + | + | - | / | / | / | / |

ERGEBNISSE

Fortsetzung Tab. 6:

| Probe | Virusnachweis mittels RT-PCR | | | Immunhistochemischer Antigennachweis | | | |
|-------|--|-------------------|-----------------|--|------------|------------|-------------|
| | + positiv; - negativ; / nicht getestet | | | + geringe, ++ mittlere, +++ starke Positivität; - negativ; / nicht getestet | | | |
| | BVD3 / PEST2 | PvMd-V / PEST2 | SH-V / PEST2 | mAk Ca3/34- 42 | mAk C16 | mAk C42 | mAk 15c5 |

Zentralnervensystem

Encephalon

+ + - - - + ++ - +++

Haut und Hautanhangsgebilde

Cutis

+ + - + - +++ - / /

Planum nasale

+ + - / / - +

Gl. interramalis

+ + - / / - -

Immunsystem

Lien

+ + - + ++ - -

Tonsilla palatina

+ + - + + - +++ / /

Ln. retropharyngealis lateralis

+ + - + + / /

Ln. ex Lc. bronchale

+ + - / / / /

Ln. cervicalis superficialis

+ + + / / - -

Ln. ex Lc. mesentericum craniale

+ + - / / / /

Ln. popliteus profundus

+ + - / / / /

Sonstige

Cor

+ + - / / - -

M. quadriceps femoris

+ + - / / - -

5. Diskussion

Im ersten Teil der folgenden Diskussion (Kap. 5.1) werden Methoden und Ergebnisse der experimentellen Superinfektion erörtert. Im zweiten Teil (Kap. 5.2) wird der Versuch vor einen breiteren Hintergrund gestellt und mögliche Einflüsse der BVDV-Infektion auf die in europäischen Zoos gehaltene Population an Kleinkantschilen besprochen. Abschließend (Kap. 5.3) werden die Konsequenzen dargelegt, die sich aus den Ergebnissen des Experiments und den Recherchen zu BVD-Infektionen bei Kleinkantschilen ergeben könnten.

5.1 Diskussion des Experiments

5.1.1 Erörterung der Methodik

Die Versuchseinheit

Als vorderster Kritikpunkt des durchgeführten Experiments gilt die Tatsache, dass der Versuch mit einem Einzeltier durchgeführt wurde. Die Gründe, die zu diesem Umstand geführt haben sind in Kapitel 3.1 dargelegt. Nach reiflicher Überlegung und in Abstimmung mit der verantwortlichen Tierschutzbehörde wurde entschieden, den Versuch auch mit einem Tier durchzuführen, um die besondere Gelegenheit, eine experimentelle Superinfektion an einem PI Wildwiederkäuer durchführen zu können, zu nutzen. Obgleich die Größe der Versuchseinheit von $n=1$ das Formulieren verallgemeinerungsfähiger Aussagen verbietet, stellt die vorliegende Arbeit einen detaillierten Fallbericht persistierender Infektion bei Kleinkantschilen und des ersten Superinfektionsversuchs zur MD bei Kleinkantschilen bzw. bei einem exotischen Wiederkäuer dar.

Die Wahl des zp BVDV

Zur experimentellen Superinfektion des PI Kleinkantschils wurde der zp BVDV-1 Stamm SH9/11 eingesetzt (Frölich und Hofmann, 1995; Fischer et al., 1998) (siehe Kap. 3.2). Dieser von Becher et al. (1999) und Harasawa et al. (2000) als ein BVDV Typ 1c bzw. 1d klassifizierte Stamm war ehemals aus Milzproben zweier Rehe isoliert worden, die als transient infiziert oder in einem frühen Stadium der MD vermutet wurden (Frölich und Hofmann, 1995). Die Wahl dieses Isolats implizierte die Nachteile, dass (1) keine Erfahrungen über Infektiosität, Immunogenität, Pathogenität und Virulenz des Isolats *in vivo* vorlagen und (2) der Grad der antigenen „Homologie“ bzw. „Heterologie“ zwischen dem persistierenden und dem superinfizierenden Virus sowie die vollständige Sequenz und die genomischen Veränderungen, die die Zytopathogenität des inokulierten Isolats bedingen nicht bekannt waren.

Praktische Aspekte der experimentellen Superinfektion

Die praktische Umsetzung der Superinfektion erfolgte durch intranasale Inokulation von 2×1 ml einer $10^{5,5}$ KID₅₀/ml Virussuspension. Unter natürlichen Bedingungen, die Ausbildung einer spontanen MD ausgenommen, würde die (Super-) Infektion von PI

Kleinkantschilen wahrscheinlich über die Inhalation oder Ingestion virushaltiger Körperflüssigkeiten erfolgen. Demzufolge und in Anlehnung an erfolgreiche experimentelle Überinfektionen bei Rindern (u.a. Brownlie et al., 1984; Wilhelmsem et al., 1991; Moennig et al., 1993; Fritzemeier et al., 1997; Fray et al., 1998; Brusckhe et al., 1998; Liebler-Tenorio et al., 1997 und 2000) wurde die experimentelle Infektion intranasal vorgenommen. Alternativ hätte die Inokulation auch intravenös (u.a. Bolin et al., 1985; Wilhelmsem et al., 1991; Sentsui et al., 2001), subkutan (Shimizu et al., 1989) oder in Form einer Kombination verschiedener Applikationswege, wie z.B. intramuskulär/intranasal (Westernbrink et al., 1989) oder intravenös/intranasal (Moennig et al., 1990; Liebler-Tenorio et al., 2000) stattfinden können. Von der subkutanen, intravenösen und intramuskulären Applikation wurde zum einen im Hinblick auf eine mögliche (lokale) Unverträglichkeit, zum anderen da es nicht dem natürlichen Infektionsweg entsprochen hätte, Abstand genommen.

Die Inokulation der Virussuspension erfolgte in Form von Tropfen, die Stück für Stück in die Nasenhöhlen des Versuchstieres gegeben wurden. Die Verwendung eines Sprühkopfes wie bei Westernbrink et al. (1989) oder Brusckhe et al. (1998) wurde bedacht, jedoch aufgrund der sehr kleinen Nasenöffnungen eines Kleinkantschils und der dadurch vermutlich größeren Verluste an Virussuspension in die Umgebung, verworfen. Da die Inokulation unter Narkose stattfinden musste, konnte auf ein Ablecken der Suspension, was einer Ingestion gleichgekommen wäre, nicht vertraut werden.

Die in der Literatur angegebenen Infektionsdosen, die bei experimentellen Induktionen von MD in Rindern durch intranasale Applikation eingesetzt wurden, variieren beträchtlich. So verwendeten z.B. Brusckhe et al. (1998) 2 ml einer 10^5 KID₅₀/ml Virussuspension, Fritzemeier et al. (1997) applizierten 3 ml einer 10^6 KID₅₀/ml und 4 ml einer $10^{6,4}$ KID₅₀/ml Virussuspension, Moennig et al. (1993) setzten eine $10^{6,4}$ KID₅₀/ml, Brownlie et al. (1984) eine 5 ml 10^7 KID₅₀/ml Virussuspension ein und Liebler-Tenorio et al. (2000) induzierten MD mittels einer $10^{8,1}$ KID₅₀/ml Virussuspension.

Der Beobachtungszeitraum

Nach Transport und Umstallung des Versuchstieres wurde dem Kleinkantschil vier Wochen Zeit gegeben, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Allgemeinzustand, Futteraufnahme und Kotabsatz wurden vom Tag der Einstallung an täglich protokolliert. Der anschließende, eigentliche Beobachtungszeitraum gliederte sich in zwei Phasen: während eines Zeitraums von 12 Wochen vor experimenteller Superinfektion wurden Vergleichswerte zu Körpermasse, Rektaltemperatur und weißem Blutbild erhoben, während eines Zeitraumes von rund sechs Wochen zudem die Ausscheidungen des PI-Tieres, Nasensekret, Speichel und Kot, auf das Vorhandensein von BVDV untersucht. Post infectionem wurde ein Beobachtungszeitraum von neun Monaten angesetzt. Die zeitliche Begrenzung erfolgte in Anlehnung an Zeiträume, die von anderen Autoren nach experimenteller Superinfektion von Hausrindern mit antigenheterologen Stämmen dokumentiert wurden (Brownlie et al., 1986; Westernbrink et al., 1989; Shimizu et al., 1989; Nakajima et al., 1993; Moennig et al., 1993; Fritzemeier et al., 1997; Loehr et al., 1998; Fray et al., 1998; Liebler-Tenorio et al., 2000; Sentsui et al., 2001) sowie unter Berücksichtigung der Zeiträume, nach denen in der Literatur beschriebene

Experimente ohne Induktion einer MD abgebrochen wurden (Westenbrink et al., 1989; Shimizu et al., 1989; Loehr, 1997; Loehr et al., 1998; Brusckke et al., 1998).

Aus dem gewählten und vergleichsweise langen Beobachtungszeitraum ergab sich die Entscheidung, das Versuchstier nur einmal wöchentlich zu fangen und zu immobilisieren, stellen doch manuelle Fixation und Narkose eines Kleinkantschils jedes Mal eine ernstzunehmendes Risiko dar. Ebenso beruhte die Wahl der Gliedmaße als Punktionsstelle für die Blutentnahme auf dem Umstand, dass dieses Verfahren über einen längeren Zeitraum reproduzierbar und im Vergleich zur Punktion der z.B. V. jugularis, mit den geringsten Risiken behaftet war.

Fang- und Narkosetechnik

Auf Grund der Wehrhaftigkeit von Kleinkantschilen und dem damit verbundenen Risiko eines neurogenen Schocks sowie der Verletzungsgefahr für Tier und Untersucher, war es zwingend notwendig, eine Form der Immobilisierung zu wählen, die gut steuerbar und über einen längeren Zeitraum reproduzierbar war sowie minimalste Nebenwirkungen implizierte. Die Verwendung eines Fangsacks ist im Hinblick auf die Sicherheit von Tier und Mensch der manuellen Fixation oder dem Einsatz eines Fangnetzes vorzuziehen. Die prominenten, sichelartig gebogenen Kanini männlicher Kleinkantschile können beim Menschen tiefe Wunden verursachen, andererseits sind Verletzungen der zierlichen Gliedmaßen von Kleinkantschilen keine Seltenheit (Husbandry Manual Lesser Mousedeer 2010).

Die Narkoseform der Inhalation wurde gewählt, da sich eine intravenöse Applikation von Anästhetika aufgrund der Wehrhaftigkeit und schlecht zugänglicher Venen am wachen Tier nicht realisieren ließ und eine intramuskuläre Injektion den nachteiligen Effekt einer langsamen Resorption mit verzögertem Wirkungseintritt besessen hätte. Alternativ zur Inhalation via Atemmaske hätte auch eine Narkosebox der entsprechenden Größe verwendet werden können. Der halogenierte Kohlenwasserstoff Isofluran ist aufgrund seiner schnellen An- und Abflutung, dadurch guten Steuerbarkeit der Narkose, der vergleichsweise geringen Toxizität und seiner hohen Wirkungspotenz ein bei Kleinsäugetern gebräuchliches Inhalationsnarkotikum (Göltenboth, 1995). Bis zum Wiedereinsetzen von Muskeltonus, Lidreflex und ersten Abwehrbewegungen wurde der Gesundheitszustand des Kleinkantschils aus unmittelbarer Nähe, bis zum Wiedererlangen natürlicher Reaktions- und Bewegungsfähigkeit aus drei bis vier Metern Abstand beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt konnte angenommen werden, dass die durch das Isofluran reduzierte myoneuronale Übermittlung wiederhergestellt war.

Einfluss von Narkose und Stress auf weißes Blutbild und Rektaltemperatur

Unter Narkose kann es in Abhängigkeit von Tierart und Narkotikum zur Verschiebung verschiedener Parameter des Blutes kommen. Es ist jedoch durch zahlreiche Untersuchungen gesichert, dass der Einfluss der Narkose umso geringer ist, je kürzer sie besteht und dass ihr Einfluss in der Interpretation vernachlässigt werden kann, sofern die Blutprobenentnahme unmittelbar nach Eintritt der Narkose erfolgt (Baronetzky-Mercier, 1995). Weit schwieriger ist es, die stressbedingten Veränderungen der Blutparameter zu vermeiden. Stress bedeutet in diesem Zusammenhang vor allem Aufregung, Fluchtversuche

und Widerstand mit entsprechender Muskelarbeit bei Fang- und Fixierungsmaßnahmen, der unter anderem die Gesamtleukozytenzahl beeinflusst. Zu Beginn der Erregung kann mit einer Leukozytose, bei längerer Dauer mit einer Leukopenie gerechnet werden (Baronetzky-Mercier, 1995). Für die Beobachtung des Verlaufs des weißen Blutbildes scheint essenziell, dass die Probenentnahme kontinuierlich zum gleichen Zeitpunkt erfolgte. Für den Vergleich der Gesamtheit der ermittelten Werte des PI Kleinkantschils mit nicht-PI Kleinkantschilen ist von Bedeutung, dass die Probenahme unmittelbar nach Erreichen des Toleranzstadiums erfolgte. Dadurch sind eher ein stressbedingter Anstieg als eine, durch die mit der Narkosetiefe zunehmende, hypotensive Wirkung des Isoflurans bedingte Abnahme der freien Zellen im Blut in der Interpretation zu berücksichtigen. Ebenso sei bei der Beurteilung der Rektaltemperaturen auf eine mögliche, erregungs- und arbeitsbedingte Hyperthermie hingewiesen. Der Einfluss dieser physiologisch vermehrten Wärmebildung auf die Gesamtheit der Messwerte wird durch den Umstand gemindert, dass die Messung stets zum gleichen Zeitpunkt und zwar unmittelbar nach Erreichen des Toleranzstadiums erfolgte und das Tier somit, wie bei der Beobachtung des Verlaufs des weißen Blutbildes, als eigene Kontrolle diente.

Virusneutralisationstest

Zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen BVDV sind sowohl der VNT als auch der ELISA adäquate Testverfahren. Als „Goldstandard“ der indirekten Nachweiseverfahren gilt der VNT (Goyal, 2005; Anonymus, 2008), der eine etablierte, speziesunabhängige und materialsparende Methode darstellt (Frey und Liess, 1971). Suboptimal war der Einsatz von Plasma- anstelle von Serumproben im VNT, da Gerinnungshemmer Probleme mit der Zellkultur hervorrufen können (Haas, 2001). Möglicherweise war das im Probenröhrchen vorliegende Natrium-Zitrat für gelegentlich auftretende, toxische Effekte in geringen Verdünnungsstufen verantwortlich. Die beabsichtigte Präparation der Blutleukozyten setzte jedoch eine Gerinnungshemmung der Blutprobe voraus. Auf die Entnahme einer weiteren Blutprobe zur Serumgewinnung musste aufgrund des insgesamt benötigten Blutvolumens verzichtet werden.

Nachweis von BVDV-RNA in Ausscheidungen, Organen und Geweben

Der Nachweis der beteiligten Viren erfolgte durch kulturelle Virusvermehrung gefolgt von der Identifizierung der Stämme mittels RT-PCR. Dieses Vorgehen gilt als eine der zuverlässigsten Methoden zum Nachweis von BVDV (Goyal, 2005). Kritisch zu betrachten ist jedoch der Einsatz von BFL-Zellen: unterschiedliche Zelllinien propagieren in unterschiedlichem Maße die Vermehrung von BVDV, so dass möglicherweise bei Verwendung von z.B. BT (bovine turbinate) -Zellen, die als eine der sensitivsten Zelllinien gelten (Goyal, 2005), eine größere Ausbeute erzielt worden wäre oder auch in Zellkultur zpE zu beobachten gewesen wären. Die RT-PCR gilt als die sensitivste Methode zur Virusidentifizierung. Nachteilig ist, dass das Verfahren nicht zwischen Nukleinsäuren lebender oder inaktivierter Viren unterscheiden und darüber hinaus auch falsch positive Ergebnisse liefern kann (Goyal, 2005). Eine Voraussetzung für hohe Sensitivität ist eine effiziente Methode der RNA-Isolierung. Das verwendete Kit wurde als eine für verschiedenste Probenmaterialien geeignete, zeitsparende und relativ einfache Methode

charakterisiert, die jedoch im Vergleich zu Extraktionsverfahren, die auf einer sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion beruhen (z.B. TRIzol[®], Gibco BRL) eine geringere Sensitivität aufweist (Scheibner et al., 2000). In Anbetracht der unter Umständen niedrigen Virustiter in Ausscheidungen und Organen des Versuchstieres hätte die Verwendung eines anderen Extraktionsverfahrens möglicherweise zu variierenden Ergebnissen geführt. Sensitivität und Spezifität der RT-PCR werden weiterhin maßgeblich durch die genetische Variabilität der BVD-Viren beeinflusst und ein diagnostischer Test sollte nach Goyal (2005) jeden der üblichen BVDV-Stämme erkennen. Diese Vorgabe wurde durch das Pestivirusprimerpaar BVD3/PEST2 (Fischer et al., 1998) erfüllt. Die entwickelten forward Primer PvMd-V und SH-V waren zur Hybridisierung innerhalb der weitestgehend konservierten 5'UTR konzipiert und wiesen, wie anhand der Sequenzierung verschiedener Amplifikate bestätigt werden konnte, explizit die beteiligten Viren PvMd und SH9/11 nach. Möglicherweise in anderen Teilen des Genoms stattgehabte Mutationen und/oder Rekombinationen wurden nicht erfasst, sie konnten die Spezifität aber auch nicht beeinflussen.

Nachweis von BVDV-Antigen in Organen und Geweben

Um die Verteilung und den Zelltropismus von BVDV in einem Kleinkantschil zu untersuchen, wurde der immunhistochemische Nachweis von BVDV-Antigen gewählt. Die Untersuchung wurde durch Dr. M. Hilbe am Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich durchgeführt, das über etablierte Methoden zum immunhistochemischen Nachweis von BVDV verfügt (u.a. Thür et al., 1996, 1997 und 1998; Hilbe et al., 2000, 2007 und 2008).

Während die oben diskutierte RT-PCR zwischen den beteiligten nzp und zp BVDV unterschied, konnte mittels Immunhistochemie die Lokalisierung von BVDV-Antigen innerhalb eines Gewebes bestimmt werden. Ob es sich dabei um Antigen des nzp oder des zp BVDV handelte, konnte nicht unterschieden werden. Obgleich jüngsten Untersuchungen zufolge RT-PCR und Immunhistochemie eine äquivalente Sensitivität aufweisen, was die Diagnostik persistierender Infektionen allgemein betrifft (Hilbe et al., 2007), mag die RT-PCR bei der Untersuchung verschiedener Organe eines Tieres in ihrer Sensitivität der Immunhistochemie überlegen sein (persönliche Mitteilung M. Hilbe, 2007). Dies würde erklären, warum einzelne Proben, z.B. Tränendrüse, Lunge, Speiseröhre, Dickdarm oder Schilddrüse (Tab. 7, Kap. 4.2.5) in der RT-PCR positive, in der Immunhistochemie jedoch negative Ergebnisse erbrachten.

5.1.2 Erörterung der Ergebnisse

Klinik, Körpermasse, Rektaltemperatur und weißes Blutbild

Zu keinem Zeitpunkt vor experimenteller Superinfektion zeigte der PI Kleinkantschil Symptome, die mit einer persistierenden BVDV-Infektion hätten in Verbindung gebracht werden können. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Informationen des das Tier begleitenden MedARKS-Reports sowie der Aussage des im Amsterdamer Artis Royal Zoo verantwortlichen Tierarztes.

Ebenso wenig konnten nach experimenteller Superinfektion klinische Anhaltspunkte für die Ausbildung einer MD verzeichnet werden. Das Auftreten eines leichten nasalen Stridors am Tag 6 *p.i.* könnte im Zusammenhang mit der mechanischen Reizung der Nasenschleimhaut während der intranasalen Überinfektion stehen. Die am Tag 42 *p.i.* beobachteten, geringfügigen petechialen Blutungen am Nasenspiegel sind möglicherweise durch das inokulierte zp BVDV bedingt. Als sicher kann dagegen ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Anpralltrauma mit Fraktur des rechten, oberen Eckzahns am Tag 28 *a.i.* und der Ausbildung eines Abszesses knapp fünf Monate später gelten. Frakturen der exponierten Kanini männlicher Kleinkantschile sind ein vergleichsweise häufig auftretendes Trauma (Husbandry Manual Lesser Mousedeer, 2010). Das Tier wurde antibiotisch versorgt; eine Extraktion des verbliebenen Stumpfes wurde nicht vorgenommen, da dies bis zur Ausgranulierung der Wundhöhle eine häufigere Narkose erfordert hätte, der das Versuchstier aufgrund der hohen Stressanfälligkeit nicht ausgesetzt werden sollte.

Trotz des durchweg als „gut“ eingestuften Allgemeinbefindens weist der zeitliche Verlauf der **Körpermasse** des Versuchstieres Schwankungen im Bereich von ~9% seiner durchschnittlichen Körpermasse von 1736 g auf (siehe Abb. 11, Kap. 4.1.1 und Kap. 9.5). Vor experimenteller Infektion findet sich ein Körpermasseverlust von 100 g (~6%) zwischen dem 64. und 57. Tag *a.i.*, der zeitnah zu einer Erhöhung der Rektaltemperatur auf 39,2°C am Tag 64 *a.i.* und einer Reduktion der Gesamtleukozytenzahl von 4,6 G/l (Tag 64 *a.i.*) auf 2,5 G/l (Tag 57 *a.i.*) liegt. Möglicherweise stehen diese Veränderungen im Zusammenhang mit der persistierenden Infektion, möglich ist aber auch, dass trotz Isolation des Versuchstieres und Durchführung keimreduzierender Maßnahmen an Personal und Gerät, der PI Kleinkantschil einem ihm bis dahin unbekanntem Erreger ausgesetzt wurde. Alternativ könnte auch ein personeller Wechsel des wenigstens drei Mal täglich erscheinenden Tierpflegers zu einer stressbedingt reduzierten Futteraufnahme geführt haben. Der Körpermasseverlust von 60 g (~3%) zwischen dem 21. und 14. Tag *a.i.*, hängt höchstwahrscheinlich mit der Zahnfraktur vom Tag 28 *a.i.* zusammen.

Nach experimenteller Infektion findet sich zwischen dem 35. und 42. Tag *p.i.* ein Körpermasseverlust von ~4%. Am 29. Tag *p.i.* konnte das überinfizierende Virus erstmals in Kot und Leukozyten des Kleinkantschils nachgewiesen werden, am 35. Tag *p.i.* allein im Kot. Am 42. Tag *p.i.* wurde eine Rektaltemperatur von 39,6°C gemessen, zudem erwiesen sich die am 35. und 42. Tag *p.i.* entnommenen Blutproben im VNT als positiv gegenüber dem zur experimentellen Infektion eingesetzten Stamm SH9/11. Während der 4. bis 6. Woche *p.i.* scheint sich das Virus im Blut bzw. über die Blutbahn verbreitet und, wie der Nachweis neutralisierender Antikörper belegt, eine immunologische Reaktion induziert zu haben. Die Vorgänge während dieser Frühphase nach experimenteller Infektion könnten die Ursache für den Körpermasseverlust in diesem Zeitraum darstellen. Ab der 6. Woche nahm der Kleinkantschil wieder mehr oder weniger stetig an Gewicht zu. Erst zwischen dem 112. und 125. Tag *p.i.* wurde erneut ein Gewichtsverlust von ~4% verzeichnet, dessen Ursache höchstwahrscheinlich in dem sich ausbildenden Abszess lag.

Im Vergleich zu anderen Kleinkantschilen, für die in der Literatur Körpermassen von 1500-2500 g angegeben werden (Karasov, 2003; National Research Council, 1991; Barrette,

1987; Ralls, 1976; Terai et al., 1998), liegt das Versuchstier mit einer durchschnittlichen Körpermasse von ~1740 g am unteren Ende des Referenzbereichs. Der Körperbau des Versuchstieres wurde als „schmächtig“ eingestuft. Die hagere Statur und die vergleichsweise geringe Körpermasse des Kleinkantschils könnten genetisch bedingt oder ein Charakteristikum der (Unter-) Art, aber auch, in Analogie zum schlechteren Wachstum von PI Rindern (Stokstad und Løken, 2002; Liebler-Tenorio, 2005), eine Folge der persistierenden Infektion sein.

Für die **Rektaltemperatur** des Versuchstieres wurden vor Superinfektion Vergleichswerte von $38,4 \pm 0,36^\circ\text{C}$ ($\bar{x} \pm s$) ($x_{\min} 37,8^\circ\text{C}$, $x_{\max} 39,2^\circ\text{C}$) bestimmt (siehe Abb. 12 und Kap. 9.5). Die Erhöhung der Temperatur auf $39,2^\circ\text{C}$ am Tag 64 *a.i.* wurde bereits im Zusammenhang mit dem zeitnah eingetretenen Körpermasseverlust diskutiert. Sieben Tage *a.i.* wurde eine Rektaltemperatur von $39,1^\circ\text{C}$ gemessen. Äußere, untypische Umstände sind für diesen Zeitpunkt nicht bekannt; eine rezidivierende Infektion infolge Immunschwäche kann nicht ausgeschlossen werden.

Nach experimenteller Infektion zeigten sich am 42. und 125. Tag *p.i.* Erhöhungen der Rektaltemperatur. Während für eine Rektaltemperatur von $40,1^\circ\text{C}$ am Tag der Euthanasie der vom Periodontium ausgehende, abszedierende Prozess verantwortlich ist, liegt für den Anstieg auf $39,6^\circ\text{C}$ am 42. Tag *p.i.* keine Erklärung vor. Wahrscheinlich ist dieser Anstieg als ein Symptom der experimentellen Superinfektion zu werten, zumal der Zeitpunkt mit der ersten Detektion des zp BVDV in Leukozyten und Kot und der Bildung neutralisierender Antikörper zusammenfällt. Während verschiedener Versuche der experimentellen Induktion von MD bei Rindern reagierten die Tiere mit einer vorübergehenden Erhöhung der Körpertemperatur (Shimizu et al., 1989; Westenbrink et al., 1989; Nakajima et al., 1993; Moennig et al., 1990; Loehr, 1997; Loehr et al., 1998; Brusckke et al., 1998).

Zum **weissen Blutbild** sei grundsätzlich bemerkt, dass Kleinkantschile, ähnlich domestizierten Rindern und Schweinen, ein lymphozytär dominiertes Blutbild aufweisen (Vidyadaran et al., 1979; Wallach und Boever, 1983). Diese Tatsache spiegelt sich in den am Versuchstier gewonnenen Ergebnissen wider.

Beim Vergleich der nach Superinfektion bestimmten Gesamtleukozytenzahlen mit den vor Superinfektion bestimmten Vergleichswerten von $4 \pm 0,87 \text{ G/l}$ ($\bar{x} \pm s$) ($x_{\min} 2,5 \text{ G/l}$, $x_{\max} 5,2 \text{ G/l}$) fällt zunächst die geringgradige Erhöhung am Tag 14 *p.i.* auf $6,54 \text{ G/l}$ auf. Gleichermaßen stiegen zu diesem Zeitpunkt die absoluten Anteile an Lymphozyten und Granulozyten auf $4,77 \text{ G/l}$ und $1,57 \text{ G/l}$. Eventuell steht diese, wenn auch geringgradige, Erhöhung in Zusammenhang mit der experimentellen Infektion und ist somit möglicherweise als eine Reaktion auf das inokulierte Virus zu werten. Im Gegensatz dazu liegt die Ursache für die Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl auf $10,5 \text{ G/l}$, die der Lymphozyten auf $7,67 \text{ G/l}$ und die der neutrophilen Granulozyten auf $2,84 \text{ G/l}$ sowie das Auftreten stabkerniger Neutrophiler am Tag 125 *p.i.* höchstwahrscheinlich in dem abszedierenden Prozess in der Maulhöhle.

Relative Anteile an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten zeigten nur geringfügige und gleichförmige Schwankungen, die sich größtenteils innerhalb des *a.i.* bestimmten

DISKUSSION

Bereichs bewegten. Ein gegenläufiges Verhältnis, eine relative Abnahme an Lymphozyten und Zunahme an Granulozyten zeigte sich allein ab dem 105. Tag *p.i.*, was höchstwahrscheinlich auf den abszedierenden Prozess in der Maulhöhle zurückzuführen ist.

Referenzwerte für Gesamtleukozytenzahl und prozentuale Anteile des Differenzialblutbildes anderer Kleinkantschile finden sich bei Wallach und Boever (1983) sowie Vidyadaran et al. (1979) (Tab. 7).

Tab. 7: Referenzwerte zum weißen Blutbild von Kleinkantschilen aus der Literatur

| Quelle | Gesamt leukozyten zahl (G/l) | Lympho- zyten | Differenzialblutbild [%] | | | Mono- zyten |
|---|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|----------|----------------|
| | | | neutrophil | eosinophil | basophil | |
| Wallach und Boever (1983) | 8,4-11 | 70 | 14-25 | 0-11 | 0-2 | 0-3 |
| Vidya- daran et al. (1979) | 8,1 ± 2,0 (5,1-11,2) | 70,4 ± 3,9 (62-74) | 21,2 ± 3,7 (19-31) | 2,5 ± 0,9 (1,5-4) | 0 | 5-6,5 |

Über den Ursprung der Werte von Wallach und Boever (1983) ist nichts bekannt. Vidyadaran et al. (1979) bestimmten Gesamtleukozytenzahlen und relative Anteile des Differenzialblutbildes in zehn Proben von zehn Individuen einer Versuchstierhaltung in Malaysia. Der Vergleich der Gesamtheit der am Versuchstier bestimmten Gesamtleukozytenzahlen (abzüglich der durch den Abszeß erhöhten Gesamtleukozytenzahl von 10,5 G/l) mit den Referenzwerten geben Hinweise auf eine Tendenz zur Leukozytopenie. Während die Gesamtleukozytenzahl des Versuchstieres durchschnittlich $4,14 \pm 1,02$ G/l ($\bar{x} \pm s$) (x_{\min} 2,5 G/l, x_{\max} 6,54 G/l) betrug, liegen die Vergleichswerte aus der Literatur bei $8,1 \pm 2,0$ G/l ($\bar{x} \pm s$) (x_{\min} 5,1, x_{\max} 11,2) (Vidyadaran et al., 1979) bzw. 8,4 - 11 G/l (Wallach und Boever, 1983). Ähnlich am unteren Ende der Referenzbereiche bewegen sich die absoluten Anteile an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Hier wird ein Vergleich jedoch dadurch erschwert und auch ungenau, als dass beide Quellen ausschliesslich prozentuale Angaben zum Differenzialblutbild liefern. Für das Versuchstier konnten absolute Lymphozytenzahlen von $3,37 \pm 0,8$ G/l ($\bar{x} \pm s$) (x_{\min} 2,05 G/l, x_{\max} 4,81 G/l) und absolute Granulozytenzahlen von $0,71 \pm 0,28$ G/l ($\bar{x} \pm s$) (x_{\min} 0,26, x_{\max} 1,57 G/l) bestimmt werden. Nach Umrechnung würde der absolute Anteil an Lymphozyten bei Wallach und Boever bei 5,88-7,7 G/l, bei Vidyadaran et al. bei ca. 4,06-7,5 G/l (3,16-8,32 G/l), der

absolute Anteil an neutrophilen Granulozyten bei Wallach und Boever bei 1,18-2,75 G/l und bei Vidyadaran et al. bei 1,07-2,51 G/l (0,97-3,47 G/l) liegen.

Eine Leukopenie ist im Allgemeinen ein Anzeichen für virale Infektionskrankheiten, wobei PI Rinder nach Potgieter (1995) und Kapil et al. (2005) eher qualitative als quantitative Störungen der Immunabwehr demonstrieren. Piccini et al. (2006) beobachteten jedoch auch in PI Rindern deutliche Leukozytopenien. Die Leukozytopenie des Kleinkantschils kann daher durchaus in Zusammenhang mit der persistierenden Infektion stehen. Differenzialdiagnostisch wären Myelosklerose, Panmyelophthise oder eine Knochenmarksatrophie sowie eine unbemerkte, weitere virale Infektionskrankheit in Betracht zu ziehen. Letztgenannte Differenzialdiagnose scheint aufgrund der isolierten Haltung des Versuchstieres, erstgenannte aufgrund eines unauffälligen lichtmikroskopischen Bildes des Knochenmarks und keinerlei Hinweis auf eine Anämie unwahrscheinlich. Auf die Bestimmung und den Vergleich einzelner Lymphozytensubpopulationen musste wegen des benötigten relativ großen Blutvolumens sowie des Mangels an Vergleichswerten verzichtet werden.

Im Gegensatz zur Gesamtleukozytenzahl und dem Anteil an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten liegen die Anteile eosinophiler Granulozyten in den publizierten Referenzbereichen (Wallach und Boeber, 1983; Vidyadaran et al., 1979). Basophile Granulozyten und Monozyten konnten in den wöchentlich untersuchten Blutaussstrichen nicht beobachtet werden, doch handelt es sich bei jeder Probe auch nur um eine Momentaufnahme aus einem Bewegungsablauf der Leukozyten im peripheren Blut, der ständigen Veränderungen ausgesetzt ist (Kraft, 1999). Folglich können die Ergebnisse zum Anteil an basophilen Granulozyten und Monozyten am Differenzialblutbild des Kleinkantschils nicht als ein Mangel an diesen Zellen gewertet werden.

Serokonversion

Während keine der vor experimenteller Infektion gewonnenen Proben neutralisierende Eigenschaften gegenüber den im VNT eingesetzten BVDV-Stämmen besaß, erwies sich die am Tag 21 *p.i.* entnommene Probe als fraglich positiv und die an den Tagen 35 und 42 *p.i.* entnommenen Proben als sicher positiv gegenüber dem inokulierten Stamm SH9/11. Die errechneten Titer lagen bei 1:4 (Tag 21 *p.i.*), 1:16 (Tag 35 *p.i.*) und 1:9 (Tag 42 *p.i.*). Ab der sechsten Woche *p.i.* fiel die Menge neutralisierender Antikörper unter die Nachweisgrenze. Die Reaktion gegenüber den *zp* BVDV-Stämmen Grub 313/83 und NADL war zu jedem Zeitpunkt negativ.

Das Auftreten von Antikörpern gegen ein spezifisches Antigen im Serum eines Tieres bedeutet eine stattgehabte Exposition des Tieres gegenüber diesem Antigen mit folgender immunologischer Auseinandersetzung (Thrusfield, 2005). Das Ergebnis des VNT zeigt, dass der PI Kleinkantschil vor der experimentellen Superinfektion keinen Kontakt zu einem anderen als dem persistierenden *nzp* BVDV gehabt hat. Theoretisch denkbar ist aber auch, dass vorhandene Antikörper mit den im VNT eingesetzten *zp* BVDV-1-Stämmen SH9/11, Grub 313/83 und NADL nicht detektiert wurden. Das an den Tagen (21,) 35 und 42 nach experimenteller Superinfektion positive Ergebnis zeigt, dass zwischen dem persistierenden

und dem superinfizierenden Virus ein Unterschied hinsichtlich ihrer Antigenität bestand, der in dem PI Kleinkantschil eine sehr spezifische Serokonversion induziert hat. Die niedrigen Titer könnten auf ein falsch-positives Ergebnis hindeuten, jedoch hätte das Heraufsetzen des Grenztiters zwar zu einer Erhöhung der Spezifität des VNT geführt, aber auch die Sensitivität des Tests gemindert und somit geringgradige, aber für den Verlauf des Versuchs bedeutende immunologische Veränderungen verschleiert. Die Reaktion wurde durch das Mitführen von Virus- und Zellkontrollen überprüft.

Ein Vergleich von Zeitpunkt und Titerhöhe mit den entsprechenden Angaben bei in der Literatur beschriebenen experimentellen Superinfektionen von Rindern zeigt, dass keiner der beiden Parameter wegweisend für den weiteren Verlauf der Infektion ist: so wurde z.B. während des ersten erfolgreichen Superinfektionsversuchs von Bolin et al. (1985) bis 17 Tage *p.i.* in keinem der acht Versuchstiere neutralisierende Antikörper nachgewiesen. Sieben der Tiere wurden zwischen der zweiten und fünften Woche *p.i.* in moribundem Zustand gefunden, darunter eines mit einem Antikörper-Titer von 1:64, während ein anderes vorübergehende Krankheitssymptome zeigte, vorerst überlebte und 52 Tage *p.i.* einen Titer von 1:16 aufwies. Westenbrink et al. (1989) inokulierten 14 PI Rinder mit heterologem zp BVDV: alle Tiere serokonvertierten innerhalb von ein bis drei Wochen, mit maximalen Titern von 1:64 bis 1:1280 in der dritten bis vierten Woche *p.i.* Zwölf der 14 superinfizierten PI Rinder erkrankten zwischen dem 17. und 99. Tag *p.i.*, zwei blieben bis zum Versuchsende gesund. In einem von Moennig et al. (1993) mit antigen-heterologem zp BVDV superinfizierten PI Bullen wurde 31 Tage *p.i.* eine nachweisbare Menge neutralisierender Antikörper festgestellt. Bis zum Tod des Tieres durch MD am 114. Tag *p.i.* stieg der Titer auf 1:640. Ähnlich verlief der Versuch von Fray et al. (1998) an einem einzelnen PI Kalb, bei dem ab dem 21. Tag *p.i.* kontinuierlich neutralisierende Antikörper gegen das inokulierte zp Virus festgestellt wurden. Die Titerhöhe stieg von 1:12 (Tag 21 *p.i.*), über 1:256 (Tage 42 und 63 *p.i.*) auf einen maximalen Titer von 1:384 an den Tagen 84 und 105 *p.i.*, um am 126. und 147. Tag *p.i.* wieder auf eine Höhe von 1:192 zu sinken. 145 Tage *p.i.* entwickelte das Tier klinische Symptome einer MD und wurde 147 Tage *p.i.* euthanasiert. Neutralisierende Antikörper wurden auch gegen die am Tag 105 und 147 *p.i.* aus dem Nasensekret sowie postmortem aus den Peyerschen Platten isolierten zp Viren detektiert, nicht jedoch gegen die zwischen dem 28. und 77. Tag *p.i.* aus Blut- (Tag 28 *p.i.*) und Nasentupferproben (Tage 49 und 77 *p.i.*) isolierten zp Viren. Weiterhin konnte 67 Tage *p.i.* trotz der Präsenz neutralisierender Antikörper zp BVDV aus einem Biopstat des Ln. cervicalis superficialis isoliert werden. Die Autoren vermuten, dass es sich bei den zp Isolaten um drei Kategorien von Viren unterschiedlicher Antigenität handelt: das superinfizierende Virus, das eine Serokonversion induzierte, die bis zum 77. Tag *p.i.* isolierten zp Viren, die möglicherweise überdauernde Subpopulationen des inokulierten Virus oder neue Rekombinanten darstellen und die ab dem 105. Tag *p.i.* gewonnenen zp Isolate, gegen die das Tier ebenfalls neutralisierende Antikörper produzierte.

Ausscheidung von nzp und zp BVDV

Das persistierende nzp BVDV wurde mittels RT-PCR ab der sechsten Woche *a.i.* kontinuierlich in den wöchentlich untersuchten Leukozyten-, Nasensekret-, Speichel-

und/oder Kotproben detektiert. Das zp BVDV konnte erstmalig am 29. Tag *p.i.* in Leukozyten und Kot festgestellt werden, am 35. Tag allein im Kot. Darauf folgte eine Phase von fünf Wochen, während der keine der untersuchten Proben ein positives Ergebnis erbrachte. Erst am 70. Tag *p.i.* zeigte sich eine Speichelprobe positiv und am 84. *p.i.* Tag eine Probe des Nasensekrets. Wiederum folgte eine Phase, in der keine Ausscheidung festgestellt werden konnte, bis in allen vom 105. Tag *p.i.* an entnommenen Speichelproben zp BVDV detektiert werden konnte.

Die weitestgehend kontinuierliche Präsenz des persistierenden nzp BVDV im Blut wie in Ausscheidungen von PI Individuen ist ein Charakteristikum dieser Verlaufsform einer BVDV-Infektion (Thurmond, 2005). Der Nachweis des superinfizierten zp BVDV verlief dagegen während mehrerer experimenteller Superinfektionen von PI Rindern ähnlich phasisch wie in der vorliegenden Arbeit. Zumeist wurde das zp Virus erstmalig im Laufe der ersten bis vierten Woche *p.i.* in Blut und/oder Ausscheidungen detektiert (Brownlie et al., 1986; Shimizu et al., 1989; Moennig et al., 1993; Loehr, 1997; Fray et al., 1998). Sofern weitere Nachweisversuche erfolgten, konnte zwischen der ersten virämischen Phase und dem Auftreten der MD kein zp BVDV isoliert werden oder es war nur intermittierend und in geringen Mengen anzutreffen, wogegen das persistierende nzp BVDV kontinuierlich feststellbar war (Shimizu et al., 1989; Moennig et al., 1993; Loehr, 1997; Fray et al., 1998). Während Nakajima et al. (1993) zp BVDV kontinuierlich aus Blut, Nasensekret, Urin und Faezes eines Rindes isolierten, das 19 Tage nach Inokulation an MD erkrankte und 57 Tage *p.i.* starb, konnten Loehr (1997) und Fray et al. (1998) zp BVDV erst wieder wenige Tage bzw. Wochen vor Ausbruch der MD in Blut, Sekreten und Exkreten nachweisen. In letztgenanntem Versuch setzte ab dem 119. Tag *p.i.* wieder eine kontinuierliche Ausscheidung von zp Virus mit dem Nasensekret ein und blieb quantitativ bis zum Tod des Tieres am 147. Tag *p.i.* stetig hoch. Im Gegensatz zu den zp Isolaten vom 49. und 77. Tag *p.i.* wurde die ab dem 105. Tag *p.i.* mit dem Nasensekret ausgeschiedenen wie auch die postmortal isolierten zp Viren durch das Serum des Tieres neutralisiert, wobei Titerhöhen von 1:8 bis 1:96 erreicht wurden. Fray et al. (1998) schlossen aus ihren Beobachtungen, dass verschiedene heterologe BVDV Stämme nicht vollständig neutralisiert werden und somit das Fortbestehen von Subpopulationen und Rekombinationen ermöglichen. Ein Ort, an dem diese molekularen Ereignisse stattfinden, könnten den Autoren zufolge die den Nasopharynx umschließenden Gewebe sein.

Der Nachweis von BVDV im Ejakulat des Versuchstieres galt vor allem der Frage, ob männliche Kleinkantschile in Analogie zum Hausrind, den Erreger auch beim Deckakt übertragen könnten (Grooms, 2004; Brock et al., 2005). Dies scheint überaus wahrscheinlich. Ob das im Ejakulat enthaltene nzp Virus jedoch aus dem Hoden, dem Nebenhoden, den akzessorischen Geschlechtsdrüsen oder abgeschilferten Zellen des Urogenitaltrakts stammte (Grooms, 2004), ist unbekannt. Post mortem konnte nzp BVDV mittels RT-PCR in Hoden und Samenblasendrüse des Versuchstieres nachgewiesen werden.

Erörterung der Sektionsbefunde

Die postmortale Untersuchung des Tierkörpers bestätigte den Verdacht einer abszedierenden, osteolytischen Periodontitis wie sie mehrfach bei Kleinkantschilen des Artis Royal Zoos, unter anderem auch dem Geschwistertier (Zb.Nr. 0214), festgestellt worden war. Die mit dieser Diagnose bei dieser Tierart einhergehende infauste Prognose veranlasste zur Entscheidung, den Superinfektionsversuch 125 *p.i.* vorzeitig abzubrechen. Zu diesem Zeitpunkt wurden weder makroskopisch noch mikroskopisch Läsionen gesehen wie sie in Anlehnung an die MD bei Hausrindern (Ramsey und Chivers, 1957; Schulz, 1959; Bielefeldt-Ohmann, 1995; Liebler-Tenorio et al., 1997 und 2000) charakteristisch gewesen wären. Während Lungenödem, intraalveoläre Hämorrhagien sowie die vorliegende Splenomegalie als akut agonales Geschehen zu werten sind, sind die Lymphadenitis des Ln. cervicalis superficialis sowie die entzündliche Infiltration der Milz aller Wahrscheinlichkeit nach eine Reaktion auf den Oberkieferabszess. Im Fall der Ln. cervicalis superficialis könnte es sich unter Umständen jedoch auch um eine Reaktion auf das inokulierte zp BVDV handeln, das via spezifischer RT-PCR in diesem Organ nachgewiesen werden konnte. Ähnliches gilt für die diagnostizierte Glomerulonephritis: sie könnte eine Folge des entzündlichen Prozesses am Kiefer, eine Reaktion auf das inokulierte zp BVDV oder eine Folge der persistierenden Infektion sein. Diffuse Glomerulonephritiden treten häufig bei chronischen Infektionskrankheiten infolge Ablagerung von Immunkomplexen auf (Weiss, 1999) und gehören zu den wenigen Alterationen, die auch bei symptomlosen PI Hausrindern beschrieben sind (Bielefeldt-Ohmann, 1995). Immunhistochemisch ließ sich BVDV-Antigen jedoch vornehmlich in Epithelzellen des Tubulussystems des Markbereichs und nur vereinzelt in der Nierenrinde nachweisen. Ebenso könnte es sich bei der katarrhalischen Gingivitis um eine Folge der chronischen Infektionskrankheit handeln, sie könnte jedoch auch durch den vorhandenen Zahnstein bedingt sein.

Bei der geringgradigen, multifokalen Pigmentierung der sonst unveränderten Leber handelt es sich nach Ausschluss von Hämosiderin und Lipofuszin durch Spezialfärbungen um eine Ablagerung des Gallenfarbstoffes Bilirubin wie sie hepatische Störungen im Bilirubin-Stoffwechsel bedingen. Im vorliegenden Fall kam es jedoch bislang nicht zu einer auffälligen Störung der Organfunktion oder zu einer Hyperbilirubinämie.

Die mikrobielle Besiedlung des Magen-Darmtrakts scheint tierartspezifisch zu sein; zum einen waren die beschriebenen Bakterienkolonien auch bei Tieren aus Archivmaterial zu finden, zum anderen konnten kulturell keine (obligat) (entero)pathogenen Mikroorganismen nachgewiesen werden. Der Vergleich mit Berichten zur mikrobiellen Zusammensetzung des Verdauungstraktes von Kleinkantschilen (Kudo et al., 1995 und 1997) bestätigen diese Annahme.

Die geringgradige entzündliche Infiltration der jejunalen Lamina propria mucosae ist als eine unspezifische Reaktion auf eine Vielzahl möglicher Prozesse zu werten, wie z.B. bakterielle oder parasitäre Infektionen; sie könnte aber auch das Initialstadium einer sich ausbildenden Läsion darstellen, wie es Liebler-Tenorio et al. (1997 und 2000) bei Hausrindern mit experimentell induzierter „late onset“ MD beobachteten.

Der postmortale Fund sternaler Hyperkeratose findet sich nach eigenen Beobachtungen häufige bei Kleinkantschilen und in verschiedenster Ausprägung; die Ursache liegt höchstwahrscheinlich in einer nicht-artgerechten Beschaffenheit des Bodenbelags an den Liegeplätzen (Husbandry Manual Lesser Mousedeer, 2010).

Verteilung von nzp und zp BVDV in Organen und Geweben

Entsprechend der ubiquitären Verbreitung eines persistierenden BVDV im PI Hausrind (Bielefeldt-Ohmann, 1995; Shin und Acland, 2001; Liebler-Tenorio et al., 2004), konnte die RNA des nzp BVDV in allen untersuchten Organen des Respirations-, Verdauungs- und Urogenitaltraktes, des Endokriniums, des ZNS, in der Haut und in Hautanhangsgebilden, in lymphatischen Organen, in der Muskulatur sowie in Strukturen des Auges des PI Kleinkantschils detektiert werden. Mittels Immunhistochemie zeigte sich, dass besonders epitheliale und lymphatische Zellen, weniger Endothelzellen und Fibrozyten BVDV-Antigen exprimierten. Stark positiv zeigten sich auch Neuronen. Das Verteilungsmuster innerhalb eines Organs entsprach somit den Beschreibungen der BVDV-Antigenverteilung bei persistierenden Infektionen von Hausrindern (Bielefeldt-Ohmann, 1995, Shin und Acland, 2001; Liebler-Tenorio et al., 2004) (siehe auch Kap. 2.3.4). Obgleich der PI Kleinkantschil während des Beobachtungszeitraumes nicht an MD erkrankte, konnte nach seiner Euthanasie RNA des inokulierten zp BVDV neben der des persistierenden nzp BVDV in Ohrspeicheldrüse, Pansen, Labmagen, Niere sowie im Ln. cervicalis superficialis detektiert werden.

Nach Liebler-Tenorio et al. (1997) werden in Fällen von „early onset“ MD die ersten Anzeichen von Diarrhoe beobachtet, sobald das zp BVDV multifokal das Epithel der intestinalen Schleimhaut infiziert hat. In späten Stadien der MD lässt sich zp BVDV neben den lymphatischen Organen und dem Darm, auch mit zunehmender Häufigkeit in Geweben des oberen Verdauungs-, des Respirations- und Harntraktes, zudem in Großhirn, Kleinhirn, Hippocampus, Hypophyse, Herzmuskel, Leber, Pankreas, Ohrspeicheldrüse, Schilddrüse, Nebennieren, Haut, Ovarien, Uterus, Hoden oder im Knochenmark nachweisen (Liebler-Tenorio et al., 1997). Nicht bekannt ist, in welchen Organen und Zelltypen vorzugsweise Rekombinationen stattfinden, die zur Generierung der „late onset“ MD-induzierenden Viruschimäre führen (Liebler-Tenorio et al., 2000). Nach Liebler-Tenorio et al. (2000) sind die pathomorphologischen Unterschiede im Vergleich zur Frühform nur sehr fein. Im Experiment erschienen Läsionen des oberen Verdauungstraktes beim Spätausbruch im Allgemeinen geringfügiger als beim Frühausbruch, im Darm dagegen ausgedehnter und nicht immer mit lymphatischen Geweben assoziiert. Als hervorstechend beim Spätausbruch stellten sich markante Wechsel von hyperplastischer zu atrophischer Darmschleimhaut, ein kompletter Strukturverlust in den Lymphfollikeln der Peyerschen Platten sowie das Vorhandensein entzündlicher Vaskulopathien in der intestinalen Submukosa dar (Liebler-Tenorio et al., 2000). Pathomorphologisch sind bei den bislang zitierten experimentellen Induktionen von „late onset“ MD bei Hausrindern fokale, hämorrhagische bis ulzerative Läsionen des oberen und unteren Verdauungstraktes, veränderte Mesenteriallymphknoten, Bronchopneumonie, Depletion von Lymphfollikeln und ulzerative Dermatitis beschrieben (Moennig et al., 1993; Fritzscheier et al., 1997; Fray et al., 1998; Sentsui et al., 2001). Die postmortale Isolierung

von zp BVDV erfolgte zumeist aus Abschnitten des unteren Verdauungstrakts, Peyerschen Platten, Milz und Mesenteriallymphknoten, seltener aus den Nieren oder peripheren Lymphknoten (Westenbrink et al., 1989; Moennig et al., 1993; Fritzscheier et al., 1997; Fray et al., 1998; Sentsui et al., 2001). In Anbetracht des Umstandes, dass das inokulierte zp BVDV bis zum 125. Tag *p.i.* in verschiedenen Organen des experimentell superinfizierten Kleinkantschils überdauert hat und vor dem Hintergrund der komplexen Vorgänge, die die Spätform der MD bedingen, kann die Möglichkeit eines späteren, über den Euthanasiezeitpunkt hinwegreichenden, Ausbruchs von „late-onset“ MD nicht ausgeschlossen werden.

5.1.3. Bestätigung der persistierenden Infektion

Vor experimenteller Superinfektion konnte über einen Zeitraum von sechs Wochen durch den kontinuierlichen Nachweis von nzp BVDV in Leukozyten des Versuchstieres und das zeitgleiche Fehlen von Antikörpern gegen BVDV, das Vorliegen einer persistierenden Infektion im Kleinkantschil 0014 (siehe Abb. 6, Kap. 2.4.4.2) bestätigt werden. Das persistierende Virus wurde via spezifischer RT-PCR beinahe kontinuierlich in Nasensekret, Speichel und Kot detektiert. Postmortal wurde in Analogie zu PI Rindern BVDV unter anderem in Epidermis, Haarfollikeln, Speichel- und Tränendrüsen sowie Epithelien des Atmungs-, Verdauungs- und Urogenitaltraktes, in lymphatischen Organen, im Endokrinium, in der Muskulatur sowie im ZNS festgestellt.

5.1.4 Hypothese zum Verlauf nach experimenteller Superinfektion

Unter klinischen Gesichtspunkten soll der Verlauf *p.i.* in die „Infektionsphase“ und die „symptomlose Phase“ (Loehr, 1997) gegliedert werden. Die von Loehr (1997) formulierte „MD-Phase“ ist während der 125 Tage *p.i.* dauernden Beobachtung nicht eingetreten, mögliche Gründe hierfür werden im folgenden Kapitel (Kap. 5.1.5) erörtert. 125 Tage *p.i.* musste der PI-Kleinkantschil aufgrund eines schweren, vom Periodontium ausgehenden Abszesses euthanasiert werden.

Werden der geringgradige Stridor (Tag 6 *p.i.*), die Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl auf 6,54 G/l (Tag 14 *p.i.*), das Auftreten geringgradiger petechialer Blutungen am Nasenspiegel (Tag 42 *p.i.*), der starke Körpermasseverlust zwischen dem 35. und 42. Tag *p.i.*, die Erhöhung der Rektaltemperatur auf 39,6°C am 42. Tag *p.i.* sowie der Nachweis neutralisierender Antikörper am 21., 35. und 42. Tag *p.i.* als klinischer Ausdruck einer Infektion gewertet, so können die ersten sechs bis sieben Wochen als Infektionsphase bezeichnet werden, während die folgenden zehn Wochen bis zur Ausbildung des Abszesses die symptomlose Phase darstellen (Abb.27).

DISKUSSION

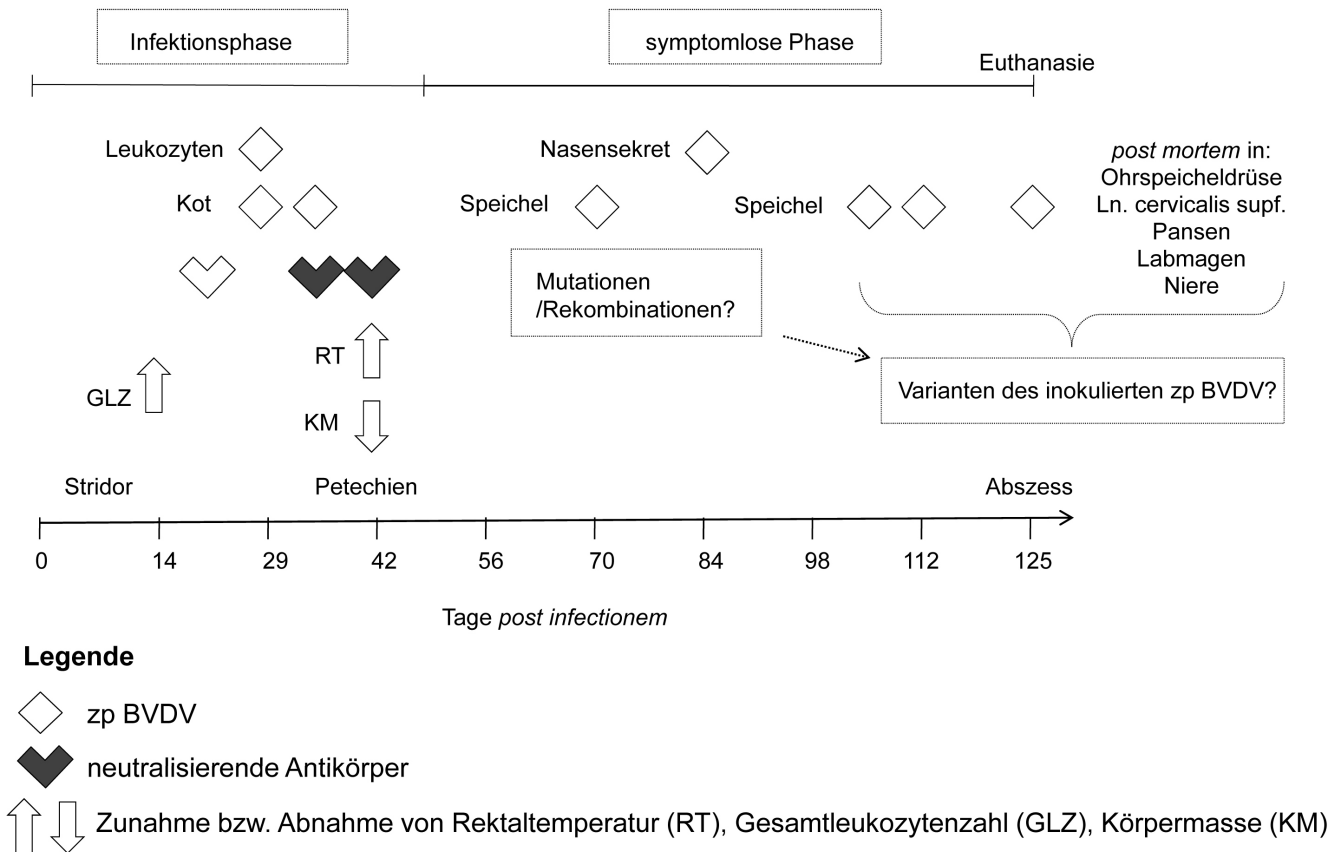


Abb. 27: Zuordnung der klinischen, hämatologischen, virologischen und immunologischen Befunde zu den von Loehr (1997) beschriebenen Phasen nach experimenteller Superinfektion beim Hausrind

Möglicherweise kam es nach intranasaler Superinfektion zu der von Liebler-Tenorio et al. (1997) vermuteten Ausbreitung des zp BVDV, die auf lympho- wie hämatogenem Weg zur Infektion von Mesenteriallymphknoten und Darmschleimhaut führt. Für diesen Umstand sprechen zum einen die beobachtete Stridor (Tag 6 *p.i.*), der Anstieg der Gesamtleukozytenzahl (Tag 14 *p.i.*), das Auftreten petechialer Blutungen am Nasenspiegel (Tag 42 *p.i.*), der Gewichtsverlust zwischen dem 35. und 42. Tag *p.i.* sowie die Erhöhung der Rektaltemperatur am 42. Tag *p.i.*, zum anderen die Tatsache, dass zp BVDV 29 Tage *p.i.* in Leukozyten und Kot und 35 Tage *p.i.* im Kot detektiert werden konnte. Während es jedoch im Falle eines Frühausbruchs der MD zur weiteren Ausbreitung des zp Virus in der Darmschleimhaut und dem Auftreten erster Anzeichen von Diarrhoe und/oder anderer klinischer Symptomen gekommen wäre, ist im Fall des PI Kleinkantschils Serokonversion eingetreten. Nachweisbare Mengen neutralisierender Antikörper gegen das inokulierte zp BVDV wurden am 21., 35. und 42. Tag *p.i.* gemessen und möglicherweise haben diese eine weitere Ausbreitung und Vermehrung des zp BVDV begrenzt.

Ab der sechsten bis siebten Woche *p.i.* trat das Versuchstier in eine weitestgehend symptomlose Phase ein, während der sich Rektaltemperatur, Gesamtleukozytenzahl und

Körpermasse normalisierten, die Menge neutralisierender Antikörper unter die Nachweisgrenze fiel und das zp BVDV weder im Blut noch in den Sekreten oder Exkreten des Tieres festzustellen war. Mittels spezifischer RT-PCR konnte das inokulierte zp BVDV jedoch ab dem 70 Tag *p.i.* in Speichel und Nasensekret sowie post mortem in Ohrspeicheldrüse, Ln. cervicalis superficialis, Pansen, Labmagen und Niere detektiert werden. Diese Funde belegen, dass die neutralisierenden Antikörper die Ausbreitung und Vermehrung des zp BVDV im Spätstadium nach experimenteller Superinfektion zwar begrenzt haben, dass das Immunsystem des Kleinkantschils den Erreger jedoch nicht vollkommen eliminiert hat. Ursächlich könnten sowohl eine durch äußere Umstände oder durch die intrauterine Infektion bedingte Immunsuppression als auch das Vorhandensein zum persistierenden Virus identischer, neutralisationsrelevanter Epitope am zp BVDV verantwortlich sein. Für die hypothetische, am 49. Tag *p.i.* einsetzende „symptomlose Phase“ wäre somit der von Fritzemeier (1996 und 1997) formulierte „Wettlauf“ zwischen Immunabwehr und Virusreplikation vorstellbar: nach nur temporärer und/oder partieller Abwehr durch das Immunsystem des PI Kleinkantschils, qualitative Störungen der Immunabwehr werden in PI Tieren häufig beobachtet (Potgieter, 1995; Kapil et al., 2005) hat wenigstens eine hypothetische Subpopulation des inokulierten zp Virus im Tierkörper überdauert. Die wiederholten Nachweise des inokulierten Stammes ab dem 70. Tag *p.i.* und post mortem stützen diese Hypothese. Möglicherweise ist es während der symptomlosen Phase zu Mutationen und/oder Rekombinationen gekommen, die zur Generation eines in seiner Antigenität angepassteren zp BVDV geführt haben. Ab dem 105. Tag *p.i.* war das zp BVDV kontinuierlich in allen untersuchten Speichelproben sowie post mortem im Gewebe der Ohrspeicheldrüse festzustellen. Möglicherweise diene dieses Organ als eine Art „Rückzugsort“, an dem das zp BVDV mutiert ist und das der entstandenen zp Viruschimäre oder Rekombinante die Möglichkeit zu effizienter Replikation geboten hat. Bei den ab dem 105. Tag *p.i.* im Speichel sowie den post mortem nachgewiesenen Viren könnte es sich demnach bereits um Rekombinanten und/oder in ihrer Antigenität veränderte Varianten des inokulierten zp BVDV handeln.

Der bis hierher formulierte hypothetische Verlauf *p.i.* entspricht in seinen Grundzügen den Beobachtungen wie sie nach experimentellen Superinfektionen von PI Hausrindern mit antigen-heterologen oder „semi-homologen“ zp BVDV beschrieben wurden (Shimizu et al., 1989; Brownlie et al., 1986; Westenbrink et al., 1989; Nakajima et al., 1993; Moennig et al., 1993; Fritzemeier et al., 1995, 1996 und 1997; Loehr et al, 1997 und 1998; Fray et al., 1998; Brusckke et al., 1998a; Sentsui et al., 2001). Zur Aufklärung der molekularen Ereignisse *p.i.* wäre eine detaillierte Untersuchung der genetischen und antigenen Eigenschaften (1) des persistierenden wie des inokulierten BVDV-Isolats, (2) der post infectionem in Blut, Leukozyten, Kot, Nasensekret und Speichel sowie (3) der post mortem in Ohrspeicheldrüse, Ln. cervicalis superficialis, Pansen, Labmagen und Niere nachgewiesenen Viren erforderlich.

5.1.5 Mögliche Gründe für das Ausbleiben klinischer und pathomorphologischer Symptome einer MD

Während eines Beobachtungszeitraumes von 125 Tagen *p.i.* wurde kein klinisches Anzeichen einer MD beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt musste das Versuchstier aufgrund eines schweren, vom Periodontium ausgehenden Abszesses und infauster Prognose euthanasiert werden. Auch die postmortale Untersuchung lieferte keine Hinweise auf eine sich ausbildende MD. Im Folgenden seien mögliche Gründe für das Ausbleiben klinischer und pathomorphologischer erörtert, die allein oder auch in Kombination gewirkt haben könnten.

Praktische Gründe

In der Planung der experimentellen Superinfektion des PI Kleinkantschils war ein **Beobachtungszeitraum** von 280 Tagen *p.i.* vorgesehen. Anknüpfend an den oben beschriebenen hypothetischen Verlauf *p.i.* wäre es möglicherweise nach Rekombination und/oder Mutation des inokulierten zp Virus und effizienter Replikation der Rekombinante/Mutante zu einem späteren, unbestimmbaren Zeitpunkt zur Ausbildung einer „Late-onset MD“ gekommen. Im Vergleich mit erfolgreichen experimentellen Induktionen bei Rindern hätte dies sowohl während des geplanten Beobachtungszeitraumes von 280 Tagen (wie z.B. in den Infektionsversuchen von Brownlie et al. (1986), Fritzsche et al. (1997) oder Fray et al. (1998)) als auch zu einem noch späteren Zeitpunkt (wie z.B. im Infektionsversuch von Sentsui et al. (2001)) geschehen können. Die eingesetzte **Infektionsdosis** von 2 ml einer $10^{5,5}$ KID₅₀/ml bewegte sich im Vergleich zu experimentellen Superinfektionen von PI Rindern (siehe Kap. 5.1.1) im unteren Bereich, es ist jedoch zu bedenken, dass der zu infizierende Organismus um ein Vielfaches kleiner war als ein Hausrind. Weiterhin ist zu erwägen, ob trotz des zu erwartenden größeren Verlusts, die **Applikation der Virussuspension** in Form eines Aerosols anstelle von Tropfen nicht möglicherweise zu einer stärkeren Anhaftung und Vermehrung des Erregers an der Eintrittspforte Nasenschleimhaut mit den entsprechenden Folgen für den Gesamtorganismus und zur Induktion einer MD geführt hätte. Abschließend sei auch bemerkt, dass das Isolat SH9/11 im **Inokulum** nicht in biologisch klonierter Form vorlag. Zytopathogene und nzp Varianten der ursprünglichen Viruspopulation könnten somit sowohl die Replikation und das Überdauern des zp Virus als auch die Immunantwort des Versuchstieres nachhaltig beeinflusst haben.

Gründe auf Seite des inokulierten zp BVDV

Auf Seite des inokulierten zp BVDV sei zunächst auf dessen **genetische und antigene Homologie bzw. Heterologie** zum persistierenden nzp BVDV eingegangen. Nach den ersten Untersuchungen zur Pathogenese der MD schien antigene Homologie ausschlaggebend für die Ausbildung der Krankheit (Brownlie und Clarke, 1993, Nakajima et al., 1993). Erst später erkannte man, dass auch semi-homologe oder antigen-heterologe zp Stämme MD auszulösen vermögen (Bolin et al., 1985; Brownlie et al., 1986; Brownlie, 1991; Brownlie und Clarke, 1993; Westenbrink et al., 1989; Shimizu et al., 1989; Fritzsche et al., 1995, 1996 und 1997; Brusckke et al., 1998b; Loehr et al., 1997 und 1998; Fray et al., 1998),

dies allerdings auf der Basis eines differierenden, pathogenetischen Mechanismus (Fritzemeier et al., 1995, 1996 und 1997).

Der intermittierende Nachweis von nzp und zp BVDV in Speichel und Nasensekret ab dem 70. Tag *p.i.* sowie der postmortale Nachweis beider Stämme in Ohrspeicheldrüse, Ln. cervicalis superficialis, Pansen, Labmagen und Niere zeigen, dass sich der inokulierte Stamm oder eine Subpopulation desselben der Immunantwort des Kleinkantschils entzogen und im Tierkörper überdauert hat. Es ist demnach möglich, dass zp und nzp BVDV wenigstens zwischenzeitlich dieselben Wirtszellen infiziert haben und es zu homologen Rekombinationen kam. Das Modell von Lai (1992) geht davon aus, dass für eine Rekombination genetisch ähnliche Bereiche zwischen den beteiligten Viren vorliegen müssen, die dem Transkriptionskomplex einen *template switch* ermöglichen. Andere Autoren unterstützen die Hypothese, dass die Möglichkeit eines *template switch*s in größerem Maße durch die Sekundärstruktur der RNA bestimmt wird als durch Sequenzidentität (Desport et al., 1998; Kameyama et al., 2006). Gallei et al. (2004) beschreiben darüber hinaus auch RNA-Polymerase-unabhängige Rekombinationen. Über das eine wie das andere kann für die am Versuch beteiligten Viren keine Aussage getroffen werden. Festgehalten werden kann jedoch die Möglichkeit, dass es sich bei dem ab dem 70. Tag *p.i.* und postmortal identifizierten (zp) Viren bereits um homo- und/oder heterologe Rekombinanten bzw. Mutanten handelt, die eine angepasstere, dieselbe oder hinreichend ähnliche Antigenität aufweisen wie der tolerierte, persistierende Stamm, wodurch eine Fortbestehen im Tierkörper ermöglicht wurde.

Neben der genetischen und antigenen Homologie bzw. Heterologie sei weiterhin die **Replikationseffizienz** des inokulierten zp BVDV besprochen: im Vergleich zu PI Tieren ist die Zahl an infizierten Zellen bei MD-kranken Rindern drastisch erhöht, auch scheint der zp Biotyp hauptverantwortlich für die klinische Manifestation der Erkrankung zu sein (Liebler et al., 1991). Bislang sind jedoch weder die Grundlage für das größere Vermögen zp BVDV, Zellen zu infizieren, noch die Grundlage für die pathogene Wirkung zp BVDV *in vivo* vollkommen geklärt (Liebler-Tenorio, 2005; Rümenapf und Thiel, 2008). Nach Rümenapf und Thiel (2008) sind zytopathogene Effekte, zumindest *in vitro*, das indirekte Ergebnis einer Überbeanspruchung zellulärer Membranen während der Replikation, während die pathogene Wirkung bei der MD *in vivo* wahrscheinlich durch das Immunsystem vermittelt wird (Liebler-Tenorio, 2005). Beide Effekte setzen eine hinreichend effiziente Replikation voraus. Über die Replikationseffizienz und die genetische Grundlage für die Zytopathogenität des inokulierten Stammes ist wenig bekannt. Einen Hinweis auf eine grundsätzlich niedrige Replikationsrate könnte jedoch der Umstand liefern, dass das re-isolierte Virus in BFL-Zellen *in vitro* bis zur dritten Passage keine zpE erzeugte, obgleich das inokulierte zp Virus mittels spezifischer RT-PCR bereits in Zellen der zweiten Passage nachgewiesen werden konnte.

Eng verknüpft mit der Replikationseffizienz eines BVDV-Isolats ist die Frage nach seiner **Pathogenität und Virulenz**, die nicht zwingendermaßen mit dem Verhalten in Zellkultur korrelieren (Ridpath, 2003). Thrusfield (2005) definiert die Pathogenität als die Fähigkeit eines Mikroorganismus, in einem Makroorganismus Krankheit zu erzeugen, während die Virulenz den Ausprägungsgrad der krankheitserzeugenden Eigenschaften eines Erregers in

einem bestimmten Wirt beschreibt. Bezogen auf das aus Rehen (*Capreolus capreolus*) stammende zp BVDV-Isolat SH9/11 könnte es sich hier um einen grundsätzlich und in jeder Wirtsspezies, ob Reh, Rind oder Kleinkantschil, nur gering pathogenen/virulenten Stamm handeln.

Gründe auf Seite des PI Individuums

Die **Immunogenität** eines Epitops ist abhängig vom Grad der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen der Tierart, aus der der Erreger stammt und der Tierart, in der es als Immunogen wirkt (Janeway, 2002). Das heißt, dass ein aus Rehen (*Capreolus capreolus*, Fam. Cervidae) stammender Erreger in der Spezies Kleinkantschil (*Tragulus spp.*, Fam. Tragulidae) wesentlich weniger immunogen wirken könnte als in einer anderen Spezies. Dies scheint vor allem von Bedeutung, da das Immunsystem in der Pathogenese der BVD/MD eine große Rolle spielt (Liebler-Tenorio, 2005). Darüber hinaus bestehen auch **individuelle Unterschiede** in der Fähigkeit eines Organismus, diese Epitope zu erkennen und darauf zu reagieren (Janeway, 2002). Dabei ist das Zusammenspiel vieler Komponenten des Immunsystems von Bedeutung, das in einem PI Individuum durch die intrauterine Infektion bereits unbestimmten Schaden erlitt. Allgemein erkranken vornehmlich PI Kälber und junge Rinder zwischen 6 und 24 Monaten an MD (Baker, 1995). Liebler-Tenorio et al. (2000) notierten nach experimenteller Superinfektion von 14 PI Rindern, dass diejenigen, die dem Spätausbruch der MD erlagen im Durchschnitt älter waren, als die, die schon früh an MD erkrankten. Bei dem im Versuch eingesetzten Kleinkantschil handelte es sich um ein knapp vierjähriges und somit adultes, klinisch gesundes Tier, dessen Immunsystem, jenseits des durch die intrauterine Infektion genommenen Schadens, voll ausgereift war und auf die Infektion mit einem Super- oder Sekundärerreger adäquat reagieren konnte. Die Superinfektion eines anderen, juvenilen oder subadulten Tieres, hätte möglicherweise einen anderen Verlauf genommen.

Ähnlich abhängig von der Tierart wie die Immunogenität eines Epitops ist die **Empfänglichkeit** einer Spezies für einen bestimmten Infektionserreger. Die ersten Schritte einer Virusinfektion sind die Bindung des Erregers (Adsorption) an einen Oberflächenrezeptor der Zelle, gefolgt von der Aufnahme des Erregers (Penetration) in die Zelle. Als Rezeptor für BVDV ist das bovine Membran-Kofaktor-Protein CD46 des C3b-Inaktivators Faktor I identifiziert worden, der eine regulierende Wirkung beim Ablauf der Komplementkaskade ausübt (Maurer et al., 2004; Rümenapf und Krey, 2008). Eine molekulare Charakterisierung des Moleküls, das auch als Rezeptor für einzelne Isolate von Masernviren, das Humane Herpesvirus 6 sowie verschiedene Serotypen humaner Adenoviren dient, erlaubte zudem die genaue Identifizierung der BVDV-Bindungsdomäne, die sich den Untersuchungen zufolge aus zehn Aminosäuren zusammensetzt (Maurer et al., 2004; Krey et al., 2006; Rümenapf und Krey, 2008). *In vitro* Untersuchungen an bovinen (MDBK-) Zellen zeigten, dass CD46 von verschiedenen, an Zellkultur adaptierten wie klinischen BVDV-Isolaten als Rezeptor verwendet wird. Durch Einsatz von Anti-CD46-Antikörpern wurde die Empfänglichkeit (Zahl infizierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle) von MDBK-Zellen für BVDV um 60-90% reduziert, während die Infektion mit anderen Pestivirusspezies (CSFV, BDV und dem Giraffenisolat) unbeeinflusst blieb. Porcine (SK6-)

Zellen zeigten im Vergleich zu bovinen Zellen eine 1000-fach geringere Empfänglichkeit für BVDV. Durch Expression von bovinem CD46 wurde die Empfänglichkeit 100-fach gesteigert. In Zellen, die sich im Allgemeinen nicht mit BVDV infizieren lassen, bewirkte die Expression von bovinem CD46 dagegen allein eine Zunahme der Bindung von BVDV (Maurer et al., 2004; Rümenapf und Krey, 2008). Substitution der entscheidenden Peptidabschnitte im porcinen CD46 durch die entsprechenden bovinen Sequenzen führte zu einer Zunahme seiner Bindungsaktivität, während die umgekehrte Substitution, das Ersetzen dieser Peptidabschnitte im bovinen CD46 durch porcine Sequenzen zu einem Verlust der Rezeptoreigenschaften führte (Krey et al., 2006a). Rümenapf und Krey (2008) schlossen aus diesen Beobachtungen, (1) dass CD46 von allen BVDV-Isolaten als Rezeptor verwendet wird und es sich nicht um ein Phänomen der Zellkulturadaptation handelt sowie (2) dass es neben CD46 als hochaffinem Bindungsrezeptor weitere, vermutlich für die Ordnung Artiodactyla spezifische Moleküle gibt, die für eine Infektion durch Pestiviren benötigt werden.

Da anzunehmen ist, dass Kleinkantschile über ein anderes Tierarten in seiner Funktion entsprechendes Komplementsystem verfügen, stellt sich die Frage, ob das CD46 eines Kleinkantschils, dessen bovines Analogon im Vergleich zum porcinen die Empfänglichkeit der Zelle für BVDV deutlich erhöht, eher dem bovinen oder dem porcinen oder keinem von beiden ähnelt. In dem Fall, dass das CD46 und auch die postulierten Korezeptoren eines Kleinkantschils den bovinen Molekülen homolog sind, wäre die Empfänglichkeit von Kleinkantschilen für BVDV höchstwahrscheinlich ähnlich der von Rindern. In dem Fall, dass das CD46 und auch die postulierten Korezeptoren eines Kleinkantschils den porcinen Molekülen homolog sind, wäre die Empfänglichkeit für BVDV im Vergleich zu bovinen Zellen ähnlich reduziert wie bei porcinen Zellen. Unterscheidet sich CD46 von Kleinkantschilen grundsätzlich, bedingen allein die noch nicht identifizierten, vermutlich spezies- und ordnungsspezifischen Korezeptoren die (nachgewiesene) Empfänglichkeit von Kleinkantschilen für BVDV.

In diesem Zusammenhang sei näher auf die taxonomische Zuordnung von Kleinkantschilen eingegangen: *Tragulus spp.* gehören zur Teilordnung Tragulina, der Schwestergruppe der Stirnwaffenträger Pecora. Die Tragulina lassen sich bis ins Eozän zurückverfolgen, existierten lange vor den Bovidae und Zervidae (Starck, 1995) und werden auch als „phylogenetische Miniatur-Vorstufe“ der eigentlichen Wiederkäuer bezeichnet (Hofmann, 2007). Entsprechend nimmt die einzige rezente Familie der Tragulina, die der Tragulidae, innerhalb der Artiodactyla eine taxonomisch isolierte Stellung ein (Grubb, 2005) (Abb. 28). Die rezenten Arten besitzen verschiedene plesiomorphe Merkmale wie z.B. das Fehlen von Stirnaufsätzen (wie bei Moschidae und *Hydropotes inermis*), den Ontogenesetyp mit diffuser Placenta epitheliochorialis (ähnlich Suina, Tylopoda und Moschidae) oder auch die in Ruhelage eingebeugten Vorder- und Hintergliedmaßen (wie Tylopoda) (Starck, 1995; Hendrichs und Frey, 2003). In der Literatur finden sich weitere morphologische, physiologische und genetische Eigenheiten der Familie der Tragulidae. Beispielhaft erwähnt seien (1) die These von Starck (1995), dass Kleinkantschile mit der niedrigen Chromosomenzahl von $2n=32$ näher an den Suidae stehen als an der Schwestergruppe der Pecora, (2) die Feststellung von Agungpriyono et al. (1994), dass, obgleich Kleinkantschile

zu den Ruminantia gehören, die Verteilung endokriner Zellen im Darm eher der von Schweinen als der anderer Wiederkäuer entspricht, (3) der Bericht von Fukuta et al. (1996 und 2007) über einzigartige, vakuolen-ähnliche Strukturen im Zytoplasma der Erythrozyten, oder (4) das Fehlen von Praeorbitaldrüsen (wie bei Bovinae) (Starck, 1995). Angesichts der Vielfalt an Gemeinsamkeiten mit, aber auch Unterschieden zu anderen Spezies der Ordnung Artiodactyla, scheint die Frage nach dem Vorkommen und der Struktur des Membran-Kofaktor-Proteins CD46 bei Kleinkantschilen Gegenstand von Spekulation und allein über eine vergleichende Untersuchung und Charakterisierung beantwortet werden zu können. Tatsächlich sind aber Kleinkantschile empfänglich für BVDV (wenigstens BVDV I), dies möglicherweise bedingt durch den von Rümenapf und Krey (2008) postulierten spezies- und ordnungsspezifischen Korezeptor.

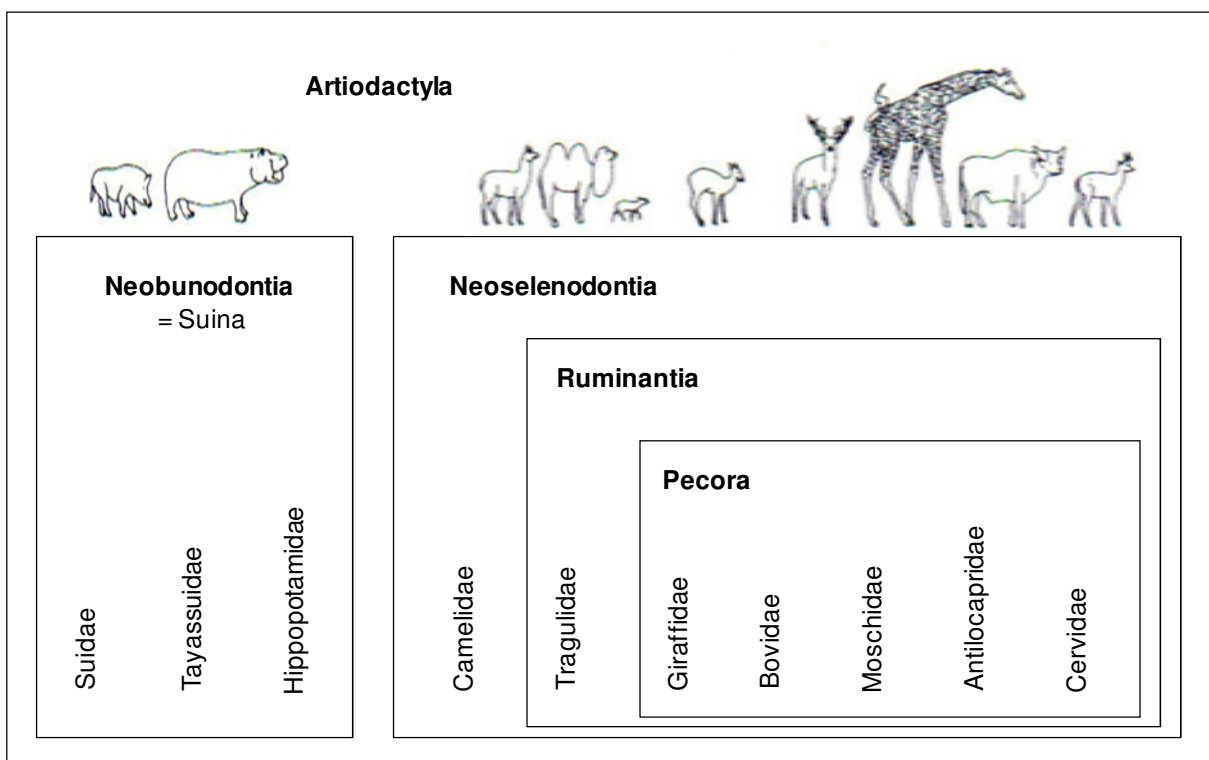


Abb. 28: Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Ordnung der Artiodactyla;
(nach Hendrichs und Frey, 2003; Illustration nach Starck, 1995)

Neben der Ungewissheit über die Struktur des CD46-Moleküls eines Kleinkantschils, stellt sich die Frage, inwiefern das superinfizierende zp BVDV zur Adsorption und Penetration auf dieses Molekül angewiesen ist. Nach den *in vitro*-Untersuchungen von Rümenapf und Krey (2008) ist auch SH9 ein Isolat, das das bovine CD46 als hochaffinen Rezeptor benutzt und dessen Infektionseffizienz bei Blockierung dieses Rezeptors um ein Vielfaches abnimmt. Im Hinblick auf den Superinfektionsversuch könnte demnach das Fehlen des bovinen CD46, der strukturellen Determinanten oder eines analogen Rezeptors bei Kleinkantschilen ein Grund für das Ausbleiben einer MD sein. Das inokulierte zp Virus konnte sich zwar vermehren,

doch hat möglicherweise eine reduzierte Empfänglichkeit des Kleinkantschils verhindert, dass es während des Beobachtungszeitraums von 125 Tagen *p.i.* die weite Verbreitung und hohe Zahl infizierter Zellen erlangte, die in MD-kranken Rindern beobachtet werden. In Anbetracht der hochaffinen Bindung von BVDV zum bovinen CD46 besteht die Möglichkeit, dass ein Kleinkantschil, sollte diese Spezies über den/die postulierten ordnungsspezifischen Korezeptor/en, aber nicht über das bovine CD46 oder einen analogen Rezeptor verfügen, aufgrund reduzierter Empfänglichkeit grundsätzlich nicht an MD erkranken kann

5.2 Das BVDV in der Population von Kleinkantschilen

Seit über drei Jahrzehnten werden Kleinkantschile in Europäischen Zoos gehalten und gezüchtet. Seit 1987 besteht ein Erhaltungszuchtprogramm (EEP) (Dekker und Schmidt, 1987), das seither durch den Amsterdamer Artis Royal Zoo, Natura Artis Magistra, koordiniert wird. Im folgenden Kapitel sollen unterschiedliche Gesichtspunkte der 2002 festgestellten BVDV-Infektion in dieser Tiergruppe erörtert werden. Daten wurden, sofern nicht anders erwähnt, während eines am Artis Royal Zoo durchgeführten Projektes zu tierzüchterischen, veterinärmedizinischen und zootecnischen Aspekten der Haltung von Kleinkantschilen zusammengetragen und aufbereitet (Husbandry Manual Lesser Mousedeer, 2010).

Rückblick

Ausgehend von sieben erfassten Gründertieren (4.3.0) (Dekker und Schmidt, 1987), erreichte die Zoopopulation Ende der 90er Jahre mit 96 (58.32.6) Tieren ihren zahlenmäßigen Höchststand; seitdem hat sich die Zahl der Individuen jedoch mehr als halbiert. (EEP Annual Reports, 1988 bis 2007) (Abb. 29). Ursächlich werden für diesen Rückgang vor allem die Folgen von In- und Kreuzungszuchten sowie der Überhang an männlichen Tieren in Betracht gezogen, aber auch die geographische Zerstreuung einzelner zuchtreifer Tiere über die verschiedenen Zoos, und die dadurch greifenden tierseuchenrechtlichen Bestimmungen erschweren eine erfolgreiche Reproduktion (persönliche Mitteilung M. van Hees und J. Szantho).

Aufgrund der Diagnose einer persistierenden Infektion mit dem BVDV (Kap. 2.4.4.2) wurden 2002 zwei adulte und zwei juvenile weibliche sowie vier männliche Tiere euthanasiert, zwei weitere adulte Männchen vom Zuchtprogramm ausgeschlossen und isoliert. Zusammen repräsentierten diese Tiere 13,2% (10/76) der Gesamtpopulation zu diesem Zeitpunkt. Insgesamt fiel die Zahl an Kleinkantschilen in europäischen Zoos zwischen 2002 und 2003 von 76 auf 59 Tiere. Nach Aufforderung durch den Zuchtbuchkoordinator wurden insgesamt 15 Tiere, die in der maternalen Linie standen oder direkten Kontakt zu PI-Tieren hatten, auf BVD-Virus, BVDV-Antigen und/oder -Antikörper getestet. Ein Zuchtpaar wurde im Jahr 2004 aufgrund eines nicht näher definierten „BVD positiven“ Testergebnisses euthanasiert. Weitere 13 Kleinkantschile aus acht zoologischen Gärten wurden zwischen 2007 und 2008 untersucht. Zwölf der letztgenannten Tiere zeigten sich Virus-, Antigen- und Antikörpernegativ, ein Tier war Antikörperpositiv. Acht Institutionen erklärten sich bereit, ihre Kleinkantschile bei nächster Gelegenheit auf eine Infektion mit dem BVDV zu testen.

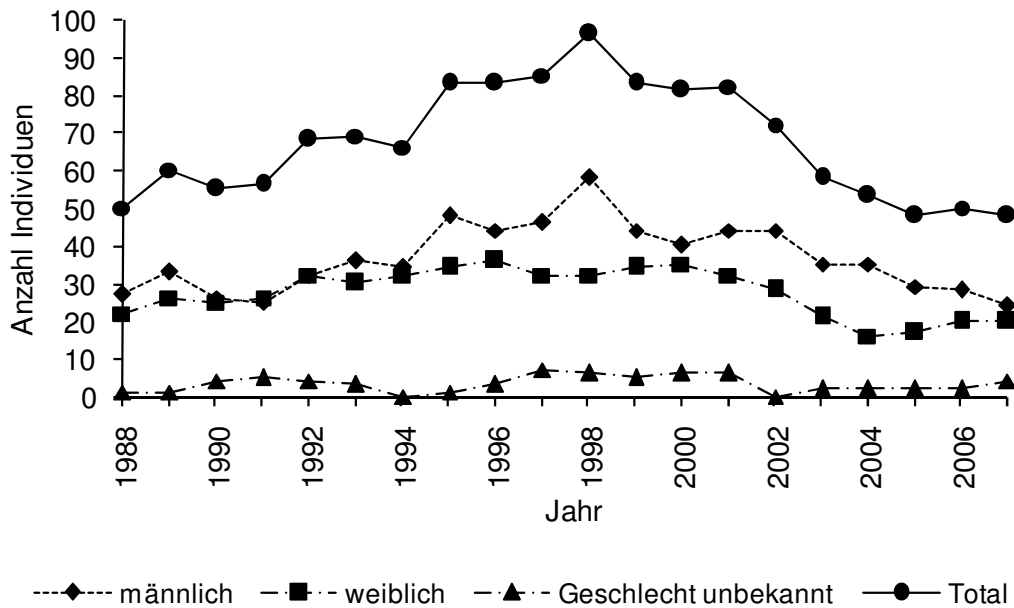


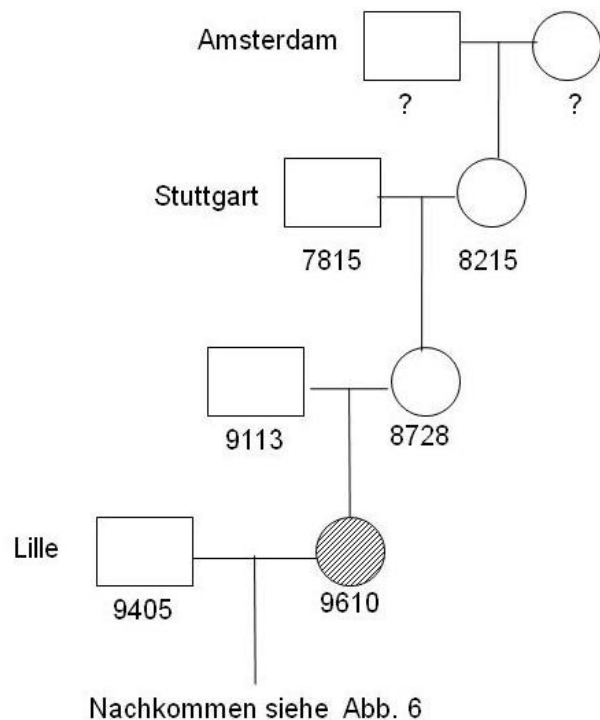
Abb. 29: Population von Kleinkantschilen in europäischen Zoos seit Gründung des EEP (1988-2007)

Zeitpunkt und Quelle der BVDV-Infektion

Die Familie der Tragulidae verfügt über eine Placenta epitheliochorialis diffusa, die offensichtlich eine intrauterine Infektion mit dem BVDV ermöglicht. In Analogie zur Etablierung persistierender Infektionen bei Hausrindern, muss die Infektion der Kleinkantschil-Feten vor Abschluss der Entwicklung ihres Immunsystems erfolgt sein. Bei Rindern erfolgt die Generierung von PI Kälbern am häufigsten bei Infektion der Mutterkuh zwischen dem 30. und 90. Trächtigkeitstag (Liebler-Tenorio, 2005), d.h. während des ersten Drittels der Gravidität. Bei Schafen fällt die kritische Phase in den Zeitraum des ersten bis zweiten Drittels (Nettleton, 1990; Løken, 1995a; Nettleton et al., 1998), beim Schwein eher in das zweite Drittel der Trächtigkeit (Walz et al., 2004). Die Gravidität eines Kleinkantschils dauert rund 140 Tage (Robin, 1979; Kudo et al., 1997), über die Embryonalentwicklung dieser Tierart gibt es kaum Untersuchungen und ein Vergleich mit anderen Tierarten wird durch die isolierte taxonomische Stellung der Gattung *Tragulus* erschwert. Betrachtet man dennoch den Zeitraum in Analogie zur Generation von PI Individuen bei Rind, Schaf und Schwein scheint die Etablierung einer persistierenden Infektion bei Kleinkantschilen während eines, das erste und/oder zweite Drittel der Trächtigkeit umfassenden, Zeitraumes bis zum ~90. Tag *p.c.* möglich. Das 2003 von Grøndahl et al. isolierte BVDV zeigte eine 93-97%ige Sequenzhomologie zu BVDV-1f Viren, die zwischen 1981 und 1998 aus Rindern in Niedersachsen, nahe der deutsch-niederländischen Grenze isoliert wurden, sowie zu BVDV-Isolaten aus Österreich, Italien, der Slowakei, Slowenien und Ungarn (Grøndahl et al., 2003a). Sehr unwahrscheinlich erscheint die Möglichkeit, dass sich ein Kleinkantschil durch direkten Kontakt zu einem PI oder transient infizierten Rind angesteckt haben könnte,

wahrscheinlicher dagegen die Hypothese, dass die Infektion indirekt z.B. während eines Transportes erfolgte (Uttenthal et al., 2006). Uttenthal et al. vermuten, dass das trächtige Muttertier 8728 von 9610 (siehe Abb. 6, Kap. 2.4.4.2, und Abb. 30) im Jahr 1996 indirekt mit dem BVDV infiziert wurde. Eigenen Recherchen zufolge hat das Muttertier von 9610 (Zb.Nr. 8728) seinen Geburtsort nie verlassen, d.h. eine Infektion hätte direkt oder indirekt innerhalb des Stuttgarter Zoos erfolgen müssen. Alternativ könnte aber auch schon das Muttertier von 8728 (Zb.Nr. 8215) PI gewesen sein, das vierjährig aus Amsterdam eingeführt wurde. Weiterhin und in Anlehnung an die Epidemiologie beim Rind, wo das BVDV auch über das Ejakulat (atypisch) persistent oder transient infizierter Bullen übertragen werden kann (Givens und Waldrop, 2004) und unter dem Aspekt, dass das Virus mehrfach im Ejakulat von Kleinkantschilen nachgewiesen werden konnte, sollte auch die Einschleppung und/oder Verbreitung des Virus über die väterliche Linie in Betracht gezogen werden. Möglich scheint daher auch, dass das Vatertier (Zb.Nr. 7815) oder der Zuchtpartner (Zb.Nr. 9113) von 8728 das BVDV in die Population eingeschleppt haben. Alternativ könnte auch der Zuchtpartner von 9610, ein Männchen mit der Zb.Nr. 9405, PI gewesen sein. Dieses Tier ist deshalb interessant, da es auch in der maternalen Linie des oben erwähnten „BVD positiven“ Zuchtpaars auftaucht. Der Kleinkantschil 9405, wurde im Mai 1994 in Odense, Dänemark, geboren und zeugte sowohl im Amsterdamer Zoo als auch im Zoo von Lille Nachwuchs, der vermutlich persistent infiziert war (Abb. 30 und 31).

Abb. 30: Darstellung der maternalen Linie der Kleinkantschile des Amsterdamer Artis Zoos (siehe auch Abb. 6, Kap. 2.4.4.2) (Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Szánthó)



Mögliche Einflüsse der BVDV-Infektion

Das BVDV wurde in der Kleinkantschilpopulation über wenigstens vier Jahre und über mindestens drei Generationen weitergegeben (Kap. 2.4.4.2). Somit könnte es retrospektiv betrachtet bei einer Vielzahl von Krankheiten oder Todesfällen in der Kleinkantschilpopulation eine Rolle gespielt haben.

Beim Hausrind verlaufen 70-90% der Infektionen subklinisch. Leichtes Fieber, eine mehr oder weniger ausgeprägte Leukopenie und geringgradige Leistungsschwäche bleiben meist unerkannt, die vorübergehende Immunsuppression kann jedoch zu gravierenden Mischinfektionen, insbesondere des Respirations- und Verdauungstraktes führen. Nach

Erstkontakt mit hochvirulentem BVDV tritt die, mit schwerem Durchfall einhergehende, akute BVD auf (Doll und Moennig, 2002; Grooms et al., 2002) (siehe Kap. 2.3.2). Als „BVD-assoziierte“ Infektionskrankheiten werden häufig Ko- oder Sekundärinfektionen mit Parainfluenza-3-Virus, Bovinem Herpesvirus-1, Respiratorischem Synzytialvirus, Respiratorischem Koronavirus oder auch *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis* und *Haemophilus somnus* gesehen (Kapil et al., 2005). Im Zusammenhang mit Erkrankungen des Verdauungstraktes werden häufig Koinfektionen mit Rota- und Koronaviren beobachtet, aber auch gleichzeitige, möglicherweise durch das BVDV potenzierte Infektionen mit *Salmonella ssp.*, *E.coli* oder dem Parapoxvirus bovis 1 sind beschrieben (Liebler-Tenorio, 2005). Eigenen Recherchen zufolge stellen Erkrankungen des Respirations- und Verdauungstraktes bei in zoologischen Gärten gehaltenen Kleinkantschilen mit zusammengenommen ~43% die häufigste Todesursache dar. Vermutlich ist wenigstens ein Viertel dieser Todesfälle infektiöser Ursache. Inwiefern eine direkte und/oder die immunsuppressive Wirkung des BVDV dabei eine Rolle gespielt hat, kann ohne Nachweis des Erregers bzw. möglicher opportunistisch oder synergistisch wirkender Keime nicht beantwortet werden.

Ebenso wenig wie die eine akute BVDV-Infektion durchlaufenden Kontakttiere, soll keiner der nachweislich oder vermutlich PI Kleinkantschile jemals klinische Anzeichen einer (BVDV-) Infektion gezeigt haben (persönliche Mitteilung M.J. Hoyer). Symptomlosigkeit ist ein Charakteristikum einer persistierenden Infektion und auch beim Hausrind fallen PI Kälber nur vereinzelt schon bei der Geburt durch kongenitale Mißbildungen, geringes Geburtsgewicht oder Lebensschwäche auf. Die Mehrzahl der PI Tiere wird normal entwickelt und klinisch gesund geboren (Baker, 1995; Doll und Moennig, 2002; Grooms et al., 2002; Stokstad und Løken, 2002) und zeigt erst in ihrer weiteren Entwicklung verschiedene funktionelle Defekte, schlechtere Wachstumsraten oder erhöhte Krankheitsanfälligkeit (Stokstad und Løken, 2002; Liebler-Tenorio, 2005). All diese Merkmale und auch die intermittierend auftretenden klinischen Symptome wie sie gelegentlich bei PI Rindern zu beobachten sind (Doll und Moennig, 2002; Grooms et al., 2002; Stokstad und Løken, 2002), wären bei den scheuen Kleinkantschilen höchstwahrscheinlich nicht aufgefallen. In diesem Zusammenhang seien die zwei, im Jahr 2000 in Amsterdam geborenen, vermutlich persistent infizierten und nach Zürich gegebenen Kleinkantschile erwähnt (Abb. 6, Kap. 2.4.4.2): beide Individuen wie auch die Kontakttiere in Zürich starben kurz nach Einführung der neuen Gruppenmitglieder. Ob die Todesfälle mit der Einschleppung des Virus in den Züricher Bestand in Zusammenhang stand, konnte nicht mehr eruiert werden (persönliche Mitteilung M.Hoyer).

Von größter Bedeutung in Rinderbeständen sind die mit einer kursierenden BVDV-Infektion einhergehenden Reproduktionsstörungen: herabgesetzte Konzeptions- und Befruchtungsraten, Umrindern, Aborte, Totgeburten oder eine erhöhte neonatale Morbidität und Mortalität können Hinweise auf eine BVDV-Infektion oder auf das Vorhandensein von PI Individuen sein (Grooms, 2004; Larson, 2005). Für die in europäischen Zoos gehaltene Population von Kleinkantschilen kann anhand des sog. *life table* insgesamt eine (zu) niedrige Geburtenrate festgestellt werden, aufgrund geringer Fertilität oder/und hoher juveniler Mortalität sowie eine (zu) kurze Lebenserwartung oder (zu) hohe Mortalitätsrate. Seit

Gründung des EEP 1987 sterben jährlich rund ein Drittel der Neugeborenen innerhalb der ersten 30 Tage. Dazu zählen nach der Kategorisierung des SPARKS (*Single Population Animal Record Keeping System*) auch diejenigen Individuen, die bereits tot geboren werden. Letztere Gruppe liegt bei Kleinkantschilen in einer Größenordnung von rund 21%. Rund 23% sterben aufgrund vermuteter (Ko- und/oder Sekundär-) Infektionen des Respirations- und Verdauungstraktes und ein weiteres Drittel verendet aufgrund unzureichender Nahrungsaufnahme, sei es durch ein gesundheitliches Problem auf Seite des Neugeborenen oder des Muttertieres. Hier sei das oben erwähnte, in 2004 aufgrund eines nicht näher definierten „BVD positiven“ Testergebnisses euthanasierte Zuchtpaar aus dem Frankfurter Zoo erneut aufgegriffen. Dieses Paar reproduzierte sich erfolgreich, doch starben von sieben der zwischen 2001 und 2004 geborenen Nachkommen vier innerhalb von 2-12 Tagen nach ihrer Geburt, ohne dass eine eindeutige Todesursache festgestellt wurde. Ein fünftes Tier zeigte eine fetale Atelektase. Nur zwei der sieben Nachkommen überlebten die ersten Wochen und wurden in andere Zoos verbracht. Zum Zeitpunkt der Nachforschungen waren jedoch auch diese Individuen aufgrund ungeklärter Ursachen gestorben (Abb. 31).

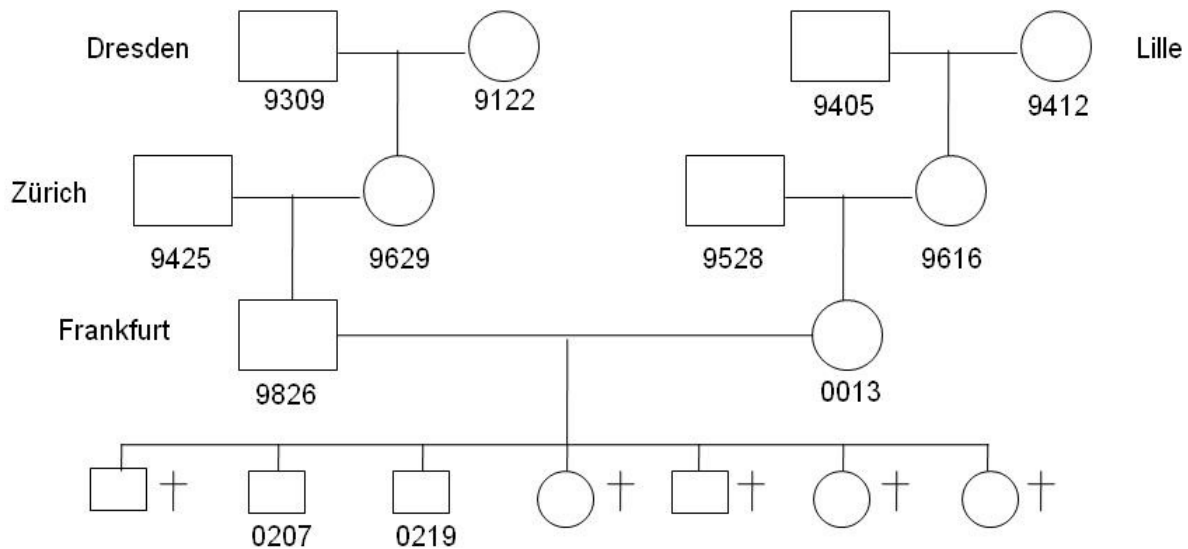


Abb. 31: Das „Frankfurter Paar“ - Ausschnitt aus dem Stammbaum der Kleinkantschile (Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Szánthó)

Kleinkantschile werden in europäischen Zoos vornehmlich in Kleinsäuger- oder Nachtthierhäusern oder auf der unteren Ebene von Volieren oder Freiflughallen präsentiert; eine Vergesellschaftung mit anderen Paarhufern findet nicht statt. Es ist daher fraglich, ob eine persistierende oder transiente BVDV-Infektion bei Erkrankungen des Atmungs- oder Verdauungstraktes, bei Reproduktionsstörungen, Totgeburten oder im Hinblick auf die hohe neonatale Morbidität und Mortalität differenzialdiagnostisch in Betracht gezogen worden wäre. Zur Analyse der häufigsten Todesursachen bei Kleinkantschilen wurden mehr als 200 Archivbefunde ausgewertet. Sektionsberichte, MedARKS-Vermerke, Karteikartennotizen u.ä. stammten aus einem Zeitraum von 1973 bis 2007 und umfassten 29 unterschiedliche Zoos.

Das Studium dieser Archivbefunde zeigte, dass mikrobiologische und/oder virologische Untersuchungen bei Kleinkantschilen nur selten durchgeführt werden. Der im allgemeinen geringe Umfang der eingesetzten labordiagnostischen Methoden bei Prophylaxe, Therapie oder Sektion scheint zum einen die in der Mehrzahl der Zoos untergeordnete Bedeutung dieser Tierart widerzuspiegeln, zum anderen die sehr unterschiedliche veterinärmedizinische Betreuung.

Das persistierende BVDV und die Empfänglichkeit der Spezies

Abgesehen von der im vorangegangenen Kapitel erörterten Möglichkeit, dass unspezifische Symptome wie Nasenausfluss, Leistungsschwäche, Kümmeren, etc. übersehen worden sein könnten, kann es sich bei dem in der Population kursierenden BVDV-1f auch um ein gering pathogenen/virulenten Stamm gehandelt haben. Bei Rindern erzeugen nach Walz et al. (2001) jene Virusstämme die schwersten Krankheitsbilder, die den höchsten Grad an Virämie erreichen. Während die Infektion mit weniger virulenten BVDV zumeist auf die lymphatischen Gewebe beschränkt bleibt und sich das Virus außerhalb dieser Gewebe nur in der Mukosa des oberen und unteren Verdauungstraktes repliziert, ist die Verbreitung hochvirulenter Stämme deutlich schneller und weitgreifender (Liebler-Tenorio et al., 2002, 2003a und b). Zur Virulenz des in die Kleinkantschilpopulation eingeschleppten nzp BVDV 1f liegen keine Informationen vor; die Möglichkeit, dass es sich um einen an sich und in jeder Spezies geringgradig pathogenen/virulenten Stamm handelt, kann somit nicht ausgeschlossen werden. Sollte dies der Fall sein, wären auch keine akuten Krankheitsverläufe zu erwarten gewesen.

Andererseits könnte es auch eine im Vergleich zum Hausrind reduzierte Empfänglichkeit von Kleinkantschilen sein, die schwere, akute Verlaufsformen in transient infizierten Tieren wie auch einen, über einen Zeitraum von wenigstens vier Jahren denkbaren, Ausbruch einer spontanen MD in einem persistent virämischen Tier verhindert hat. Ist das in der Kleinkantschil-Population kursierende BVDV wie andere *in vitro* untersuchte BVDV-Stämme (Rümenapf und Krey, 2008) (siehe Kap. 5.1.5) bei der Invasion auf das bovine Membran-Kofaktor-Protein CD46 angewiesen, könnte eine abweichende Formation der bindungsentscheidenden Strukturen am CD46 eines Kleinkantschils eine hocheffiziente Infektion der Zielzellen unterbunden haben. Entsprechend könnte das BVDV zwar über den postulierten, CD46-unabhängigen Korezeptor oder die von den Autoren erwähnten alternativen Rezeptoren einzelne Zellen infizieren, eine schnelle und hocheffiziente Replikation und Verbreitung bliebe ihm jedoch verwehrt. Ein Hinweis für diese Hypothese findet sich bei Grøndahl et al. (2003a): den charakterisierenden Untersuchungen zufolge vermehrte sich das Kleinkantschil-Isolat zwar in porzinen Zellen, jedoch zu wesentlich niedrigeren Titern als in bovinen Zellen. Dies entspricht den *in vitro* Beobachtungen von Rümenapf und Krey (2008), die mit einer Reihe von BVDV-Isolaten in porzinen Nierenzellen eine 1000-fach geringere Empfänglichkeit als in bovinen Nierenzellen verzeichneten. Die isolierte taxonomische Stellung der Familie der Tragulidae wie die vielfältigen morphologischen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede der Gattung *Tragulus* mit bzw. zu den Suidae, Bovidae, Bovinae oder Pecora, wurde bereits in Kapitel 5.1.5 erörtert. Ob und inwiefern das CD46-Membran-Kofaktor-Protein eines Kleinkantschils strukturell eher dem

bovinen Analogon, eher dem porzinen Analogon oder keinem von beiden ähnelt, ist nicht bekannt, möglicherweise beruht die Empfänglichkeit von Kleinkantschilen für BVDV allein auf dem von Rümenapf und Krey (2008) postulierten, ordnungsspezifischen Korezeptor.

Die horizontale und vertikale Übertragung sowie das Überdauern von BVDV in der Spezies Kleinkantschil zeigen, dass sich das Virus trotz der vielfältigen Abhängigkeiten und Interaktionen bei der Invasion wie bei der Replikation des Virus in der Spezies Kleinkantschil nicht nur vermehren, sondern auch die für das Fortbestehen des BVDV bedeutenden persistierenden Infektionen etablieren kann. Möglicherweise bedingt jedoch eine vergleichsweise verminderte Empfänglichkeit ihrer Zellen auch eine vergleichsweise verminderte Replikationsrate. Uttenthal et al. (2006) beobachteten nach Sequenzvergleichen der aus den PI Individuen 9812, 0109, 0205, 0105 und 0213 (Abb. 6, Kap. 2.4.4.2) isolierten Viren eine für ein RNA-Virus bemerkenswerte Stabilität des neuen BVDV-Stammes. Auch diesem Umstand könnte eine verminderte Empfänglichkeit und Replikationsrate in der Gattung *Tragulus* zugrundeliegen.

5.3 Konsequenzen

Bislang sind weder akute, transiente Verlaufsformen der BVD noch die fatale MD in Kleinkantschilen diagnostiziert worden, sei es durch Zufall, durch reduzierte Empfänglichkeit der Spezies und/oder geringe Immunogenität, Replikationseffizienz bzw. Virulenz der beteiligten BVDV-Stämme. Möglicherweise treten Verlaufsformen, die eine hocheffiziente Replikation des Virus voraus setzen in dieser Tierart grundsätzlich nicht auf, BVDV wäre für Kleinkantschile somit geringgradig virulent oder sogar avirulent. In epidemiologischer Hinsicht und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass BVDV sehr wohl persistierende Infektionen in dieser Tierart etablieren kann, würde die Gattung *Tragulus* somit allein die Rolle eines Reservoirs und möglichen Überträgers von BVDV innehaben.

Das Risiko der Ausbildung homo- oder heteronomer Infektketten

Unter Einbeziehung der Veröffentlichungen von Hoyer et al. (2003 und 2005), Grøndahl et al. (2003a und b) und Uttenthal et al. (2005 und 2006) konnte die vorliegende Arbeit demonstrieren, dass BVDV in Kleinkantschilen (*Tragulus spp.*) nicht nur erfolgreich überdauert und sich vermehrt, sondern auch kontinuierlich mit den Sekreten und Exkreten des Tieres ausgeschieden wird. Nicht-zytopathogenes BVDV wurde in der Nasenschleimhaut und im Nasensekret, in der Ohrspeicheldrüse und im Speichel, in Epithelien des Magen-Darmtrakts und im Kot, in epithelialen Zellen der Nieren und in der Harnblase sowie in Intermandibular- und Tränendrüse, zp BVDV in Nasensekret, Kot, in der Ohrspeicheldrüse und im Speichel, in den Vormägen und der Niere detektiert. Entsprechend der Epidemiologie der BVD/MD beim Hausrind (Liebler-Tenorio, 2005), könnten diese Viren in anderen empfänglichen Spezies zu akuten BVDV-Infektionen oder im Falle von PI Individuen, gegebenenfalls zur MD führen.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass BVDV und andere Pestiviren keine hohe Wirtsspezifität aufweisen, sondern die Speziesbarriere durchbrechen können (Ames, 2005). Auch experimentell gelang durch indirekten bzw. direkten Kontakt die Übertragung des Virus

sowohl vom nicht-domestizierten Paarhufer (Kleinkantschil, *T. javanicus* spp., Fam. Tragulidae) auf das Hausrind (Grøndahl et al, 2003b; Uttenthal et al., 2006) als auch vom Hausrind auf einen nicht-domestizierten Paarhufer (Weißwedelhirsch, *Odocoileus virginianus*, Fam. Cervidae) (Passler et al., 2009).

Da Kleinkantschile in unseren Breitengraden ausschließlich in Zoos gehalten werden und ein direkter Kontakt zwischen den Spezies, auch bei der zunehmenden Zahl an Transporten (EEP Annual Reports, 1990 bis 2006) mehr als unwahrscheinlich ist, stellen sie für europäische Nutztierbestände an sich kein Infektionsrisiko dar. Andererseits hat das isolierte Virus 93-97% Homologie zu BVDV-Isolaten von Hausrindern gezeigt, was die Vermutung nahelegt, dass der Erreger durch indirekte Infektion, möglicherweise während eines Transports, vom Hausrind in die Kleinkantschil-Population gelangte (Uttenthal et al., 2005 und 2006). In diesem Zusammenhang sei auf den Fall eines weiblichen Kleinkantschils hingewiesen, der 2004 aus Budapest in den Amsterdamer Artis Zoo gebracht wurde. In der ersten Untersuchung auf BVDV zeigte sich das Tier als Virus-positiv und Antikörper-negativ und verblieb Wochen in Quarantäne. Erst weitere Tests konnten den Verdacht einer persistierenden Infektion widerlegen und den einer transienten Infektion bestätigen. Ob das Tier sich die Infektion im Budapester Zoo oder während des Transportes zugezogen hat, konnte nicht nachvollzogen werden (MedArks Report, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Hoyer).

Ebenso mag innerhalb eines zoologischen Gartens kein Risiko einer direkten Infektion anderer Paarhufer bestehen, werden Kleinkantschile doch vornehmlich in Kleinsäuger- oder Nachtierhäusern oder auf der unteren Ebene von Volieren oder Freiflughallen präsentiert und findet eine Vergesellschaftung mit anderen Paarhufern in europäischen Zoos bislang nicht statt. Es sei jedoch auf das Risiko hingewiesen, den Erreger mit Vektoren wie Transportfahrzeugen, Schuhwerk, Kleidung, veterinärmedizinischen und anderen Geräten und Instrumenten zu verbreiten. Unter diesem Aspekt ist eine indirekte Infektion anderer Paarhufer, z.B. seltener Nutzierrassen, und das Herausragen des Erregers aus dem Zoo sehr wohl denkbar.

Auch wenn das Infektionsrisiko für BVDV sehr stark von der epidemiologischen Situation abhängt (Möstl et al., 2008) und im Bezug auf Kleinkantschile sehr gering sein mag: im Sinne der internationalen Eradikationsbestrebungen, in Anbetracht der Gefährdung der bislang erzielten, teuren Sanierungserfolge in Nutztierbeständen und der möglicherweise, gravierenden Folgen für andere in menschlicher Obhut gehaltene Wildtierpopulationen sollte die Überwachung des BVDV-Status bei Kleinkantschilen und anderen exotischen Paarhufern in Zoonhaltung einen festen Platz einnehmen.

Überwachung des BVDV-Status bei Kleinkantschilen

Angesichts der möglichen Folgen, die die Verschleppung von BVDV haben kann, sollte jeder in einen zoologischen Garten einzuführende Kleinkantschil ebenso wie andere Neuzugänge aus der Ordnung der Artiodactyla im Rahmen der Quarantäne auf das Vorliegen einer transienten oder persistierenden Infektion geprüft werden. Für internationale Transporte ist nach Maßgabe der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) die Durchführung eines

Erregernachweises auch vor dem Transport unerlässlich. Basierend auf den Empfehlungen der OIE wurden in Deutschland verschiedene Methoden durch das Friedrich-Loeffler-Institut anerkannt: die amtliche Methodensammlung für die Untersuchung der Bovinen Virusdiarrhoe vom 30. Oktober 2008 beschreibt sowohl die Verfahren als auch die möglichen Probenmaterialien für die BVDV-Diagnostik und beziffert die Zeiträume, die je nach Sensitivität der Methode bei Verdacht auf eine persistierende Infektion bis zu einer konfirmatorischen Untersuchung einzuhalten sind.

Speziell für den Kleinkantschil sei Folgendes bemerkt: aufgrund ihrer hohen stress-induzierten Mortalität ist für jede Form von Probenahme eine kurzzeitige Narkose notwendig. Bei der Untersuchung von Blutproben sei auf das begrenzte Volumen hingewiesen, das aus einem Kleinkantschil gewonnen werden kann, zur Untersuchung von Stanzproben der Haut sei bemerkt, dass in der vorliegenden Arbeit zwar die Verteilung von BVDV-Antigen in der Haut der von PI-Rindern entsprach, es sich aber um nur ein Individuum handelt und auch vergleichende Untersuchungen von transient infizierten Kleinkantschilen fehlen. Zusammen mit den Funden von Carman et al. (2005), Foster et al. (2007), Passler et al. (2007) und Duncan et al. (2008), die persistierende Infektionen bei Alpakas (*Lama pacos*) bzw. Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) untersuchten (Kap. 2.4.4.4 und 2.4.5), scheint sich aber die Verteilung von BVDV-Antigen in der Haut und in anderen Organsystemen persistent virämischer, exotischer Wiederkäuer nicht von der bei Hausrindern zu unterscheiden. Der Nachweis von PI Rindern kann durch die Aufnahme von BVDV-antikörperhaltigem Kolostrum bis zum 3. Lebensmonat, unter Umständen sogar bis zum 6. Lebensmonat, beeinträchtigt sein (Wolf, 2008). Kleinkantschil-Jungtiere werden normalerweise nach einer Säugeperiode von 10 bis 13 Wochen entwöhnt und erreichen im Alter von drei bis fünf Monaten Geschlechtsreife (Robin, 1979; Kamis et al., 1994). Dies ist im Allgemeinen der Zeitpunkt, an dem die Tiere von ihren Elterntieren getrennt und in eine andere Gruppe, möglicherweise eines anderen zoologische Gartens, eingeführt werden. Auch bei Kleinkantschilen sollte eine mögliche Reduktion von BVD-Virus und BVDV-Antigen im peripheren Blut durch die Aufnahme kolostraler Antikörper in Betracht gezogen werden. Jüngsten Untersuchungen zufolge (Hilbe et al., 2007; Wolf, 2008; Fux, 2008) ermöglicht jedoch die Untersuchung von Hautbioptaten oder EDTA-Vollblut auch in der kolostralen Phase eine zuverlässige Diagnose persistent infizierter Individuen. Neben dem Einsatz der Immunhistochemie sei aber auf den Vorteil der RT-PCR verwiesen, die neben der Diagnose auch die aus epidemiologischer Sicht wichtige Möglichkeit der Sequenzdifferenzierung verschiedener Stämme ermöglicht.

5.4 Die Untersuchung zur BVD/MD bei Kleinkantschilen

Die Frage des experimentellen Teils dieser Arbeit war, ob ein mit nzp BVDV PI Kleinkantschil (*Tragulus spp.*) nach Superinfektion mit einem zp BVDV-Isolat an MD erkranken würde. Diese Frage muss zunächst mit „nein“ beantwortet werden. Ob jedoch die Wahl des inokulierten zp BVDV, dessen Immunogenität, Replikationseffizienz oder Virulenz, die eingesetzte Infektionsdosis, der gewählte Infektionsweg, individuelle Vorraussetzungen des Versuchstieres, eine im Vergleich zum Hausrind reduzierte Empfänglichkeit der Spezies

und/oder der Zufall für diesen Verlauf verantwortlich sind, kann nicht abschließend beurteilt werden. Dies vor allem, da zu viele unbekannte Faktoren am Geschehen beteiligt waren und auch der Zufall bei einer Versuchstierzahl von $n=1$ (und auch $n=2$) nicht ausgeschlossen werden kann. Kenntnis der genetischen Grundlagen der inokulierten *zp* Isolats hätte eine weitergehende Untersuchung der molekularen Voraussetzungen des Virus, wie z.B. Abhängigkeit von zellulären Kofaktoren oder einem Helfervirus sowie die Analyse von Rekombinationsereignissen, die sich möglicherweise nach Superinfektion im Versuchstier zugetragen haben, ermöglicht. Die außerordentliche Gelegenheit, eine experimentelle Superinfektion an einem PI exotischen Wiederkäuer durchzuführen, wurde jedoch auch genutzt, da sie die Möglichkeit bot, die Ausscheidung des BVDV über die Zeit und in verschiedenen Sekreten und Exkreten des PI Kleinkantschils sowie die Verteilung von BVDV und BVDV-Antigen in seinen Organen und Geweben zu untersuchen. Beides entsprach weitestgehend den Beschreibungen persistent infizierter und experimentell superinfizierter Rinder.

Der PI Kleinkantschil stammte aus einer Zuchtgruppe des Artis Royal Zoos, Amsterdam. Im Rahmen eines Projektes zur Haltung und Zucht von Kleinkantschilen, wurden retrospektiv Daten zusammengetragen, die möglicherweise im Zusammenhang mit der seit spätestens 1998 in der Kleinkantschil-Population kursierenden BVDV-Infektion standen. Dabei konnten verschiedene Möglichkeiten der Einschleppung des Erregers und der Auswirkungen, die die BVDV-Infektion auf die Kleinkantschil-Population und einzelne Individuen gehabt haben könnte, herausgearbeitet werden. Obgleich es sich bei den eruierten Quellen und Folgen um Hypothesen handelt, schien es für die Zukunft sinnvoll, mögliche Ursprünge zu benennen und auf eventuelle klinische Zusammenhänge hinzuweisen, um in der Zukunft der Wiederholung einer BVDV-Infektion bei Kleinkantschilen vorzubeugen bzw. das BVDV als Infektionserreger innerhalb der epidemiologischen Einheit Zoo frühzeitig zu erkennen.

In Anbetracht der möglicherweise gravierenden Folgen, die die Verschleppung des BVDV mit sich bringen kann, empfiehlt es sich, innerhalb eines Zoos auf eine strikte Hygiene zu achten und alle Neuzugänge, die potenziell für BVDV empfänglich sind, im Rahmen der Quarantäne auch einer Screeninguntersuchung auf BVDV zu unterziehen.

Für den Erkenntnisgewinn, ob auch exotische Wiederkäuer an MD erkranken können, empfiehlt es sich, bei klinischen Verdachtsfällen einer (akuten) BVD oder der MD, eine eingehende pathologische, immunhistochemische und virologische Untersuchung einzuleiten.

6. Zusammenfassung

Untersuchung zur Bovinen Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD) bei Kleinkantschilen

Beim Hausrind werden nach Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe Virus (BVDV) verschiedenste Verlaufsformen beobachtet, von subklinischen Infektionen bis hin zu akuten Krankheitsverläufe mit Todesfolge. Im Mittelpunkt steht jedoch die Infektion empfänglicher, tragender Rinder, die zur Fruchtresorption, zum Abort, zu kongenitalen Defekten oder zur Geburt persistent infizierter (PI) Tiere führt. Kernproblem der persistierenden Infektion ist, dass die virämischen Tiere klinisch zunächst meist gesund erscheinen, den Erreger aber lebenslang und in großen Mengen ausscheiden. Nach Superinfektion von PI Tieren mit dem zytopathogenen (zp) Biotyp des BVDV kann die sporadisch zu beobachtende, fatale Mucosal Disease (MD) ausgelöst werden.

Der serologische Nachweis sowie Isolierung von BVDV gelang bei einer Vielzahl unterschiedlicher Arten von freilebenden wie in menschlicher Obhut gehaltenen exotischen Wiederkäuern. Hinsichtlich der MD gibt es zwar einige klinische Beschreibungen, jedoch keine bestätigten Nachweise. Die Fragestellung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit war deshalb, ob ein persistent mit nicht-zytopathogenem (nzp) BVDV infizierter Kleinkantschil nach Superinfektion mit einem zp BVDV an MD erkranken würde. Bei dem Versuchstier handelte es sich um einen vierjährigen, männlichen Kleinkantschil aus der Zuchtgruppe des Artis Royal Zoos, Amsterdam, in der in 2002/2003 acht von elf Individuen als PI diagnostiziert wurden; alle PI Tiere waren Nachkommen desselben Muttertieres. Das persistierende Virus wurde als ein BVDV-1f charakterisiert. Abgesehen von der Beschreibung persistierender Infektion in einer freilebenden Elenantilope (*Taurotragus oryx*), handelte es sich zu diesem Zeitpunkt um den ersten Nachweis persistierender Infektion und vertikaler Transmission von BVDV bei einem exotischen Wiederkäuer, der die außerordentliche Gelegenheit bot, das Vorkommen der MD bei einem nicht-domestizierten Wiederkäuer experimentell zu untersuchen.

Der Versuch umfasste eine mehrmals täglich stattfindende adspektorische Untersuchung sowie eine wöchentliche Inhalationsnarkose, während der der Kleinkantschil eingehend untersucht und Blut-, Nasensekret-, Speichel- und Kotproben sowie zweimalig Ejakulat gewonnen wurden. Am Tag 85 nach Beginn der Beobachtung erfolgte die experimentelle Infektion des PI Tieres mit dem aus Rehen isolierten und als BVDV-1c/1d identifizierten, zp BVDV SH9/11.

Bis 125 Tage *post infectionem* (*p.i.*) konnten keine klinischen Symptome einer MD beobachtet werden. Das inokulierte zp BVDV wurde, neben der kontinuierlichen Ausscheidung des persistierenden nzp BVDV, erstmals am Tag 29 *p.i.* in Leukozyten und Kot nachgewiesen. An den Tagen 70, 105, 112 sowie 125 *p.i.* konnte es im Speichel detektiert werden, am Tag 84 *p.i.* im Nasensekret. Während keine der vor experimenteller Infektion gewonnenen Blutproben neutralisierende Eigenschaften gegenüber den im Virusneutralisationstest eingesetzten BVDV-Stämmen besaß, erwiesen sich die an den

Tagen 35 und 42 *p.i.* entnommenen Proben als positiv gegenüber dem zur experimentellen Infektion eingesetzten Stamm SH9/11. Aufgrund einer hochgradigen, abszedierenden Periodontitis und Otitis musste der Kleinkantschil 125 Tage *p.i.* euthanasiert werden. Auch während der postmortalen Untersuchung wurden weder makroskopisch noch mikroskopisch Läsionen gesehen wie sie in Anlehnung an die MD bei Hausrindern charakteristisch gewesen wären. Mittels spezifischer RT-PCR konnte die RNA des nzp BVDV in allen untersuchten Organen des Respirations-, Verdauungs- und Urogenitaltraktes, des Endokriniums, des ZNS, in der Haut, lymphatischen Organen, Muskulatur sowie Strukturen des Auges detektiert werden, während das inokulierte zp BVDV allein in Ohrspeicheldrüse, Pansen, Labmagen, Niere sowie im Ln. cervicalis superficialis des Kleinkantschils zu finden war. Via Immunhistochemie zeigte sich, dass das Verteilungsmuster innerhalb eines Organs den Beschreibungen der BVDV-Antigenverteilung bei persistierenden Infektionen von Hausrindern entsprach.

Zusammengefasst formuliert: nach Superinfektion eines PI Kleinkantschils mit einem partiell homologen zp BVDV-Isolat konnten weder klinisch noch pathomorphologisch Veränderungen einer MD beobachtet werden, jedoch kam es trotz Serokonversion auch nicht zur vollständigen Eliminierung des inokulierten zp BVDV. Somit kann die Möglichkeit eines späteren, über den Euthanasiezeitpunkt hinwegreichenden, Ausbruchs von „late-onset“ MD, wie er für das Hausrind beschrieben ist, nicht ausgeschlossen werden. Das Ausbleiben einer MD könnte jedoch auch Folge einer reduzierten Empfänglichkeit von Kleinkantschilen für BVDV sein. (Haus-) Rind und Schaf, für die MD bzw. MD-ähnliche Syndrome beschrieben sind, gehören taxonomisch zur Unterordnung der Pecora, während Kleinkantschile zu der phylogenetisch sehr alten Unterordnung der Tragulina gezählt werden. Möglicherweise bedingt eine im Vergleich zu den Bovinae oder Bovidae variierende zelluläre Disposition eine reduzierte Empfänglichkeit der Tragulidae, die persistierende Infektionen und damit den Status eines Übertragers von BVDV, ermöglicht, aber das Auftreten akuter Verlaufsformen und der MD verhindert.

Weiterhin wurde untersucht, ob die kursierende BVDV-Infektion einen Einfluss auf die abnehmende Populationsgröße von Kleinkantschilen in europäischen Zoos gehabt haben könnte. Durch das Studium von Zuchtbuch und veterinärmedizinischen Archivbefunden wurden Hinweise gefunden, die dem BVDV möglicherweise eine Rolle als prädisponierender Faktor für Misch- und Koinfektionen sowie bei der vergleichsweise hohen Mortalitätsrate unter Neonaten bei Kleinkantschilen zukommen lassen.

Die vorliegende Arbeit illustriert die Bedeutung, die BVDV auch bei in menschlicher Obhut gehaltenen exotischen Wiederkäuern haben kann. Auch wenn das Risiko einer direkten Infektion anderer Paarhufer durch Kleinkantschile sehr gering ist, ermöglicht die Infrastruktur vieler Zoos doch eine indirekte Verschleppung des BVDV, die zur Infektion anderer empfänglicher Spezies führen könnte. Es empfiehlt sich daher, innerhalb eines Zoos auf eine strikte Hygiene zu achten und alle Neuzugänge, die potenziell für BVDV empfänglich sind, im Rahmen der Quarantäne auch einer Screeninguntersuchung auf BVDV zu unterziehen.

7. Summary

Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease (BVD/MD) in Lesser Mousedeer

Infections of cattle with Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) can result in a wide spectrum of clinical manifestations, from subclinical infections to fatal disease. Infection of susceptible pregnant cattle can result in early embryonic death, abortion, congenital defects or birth of a persistently infected (PI) calf. An initially normal clinical appearance associated with lifelong shedding of large amounts of virus particles is the hallmark of PI animals. When superinfected with a cytopathogenic (cp) strain of BVDV, PI cattle will succumb to Mucosal Disease (MD).

Evidence for BVDV infections in free-ranging or captive wild ruminants is shown by multiple serologic surveys and virus isolations. Disease entities that resemble MD in cattle have been described in different ruminant species, but they all lack virologic confirmation. Therefore, the major objective of the present study was to find out whether a PI exotic ruminant, a 4-year-old, male Lesser Mousedeer (*Tragulus spp.*) would develop clinical signs of MD following experimental superinfection with a cp strain of BVDV. The experimental animal was born in a collection of eleven individuals at Artis Royal Zoo, Amsterdam, where in 2002/3003, eight of these clinically healthy mousedeer were found to be PI. All BVDV positive animals were born to the same dam or to her offspring, the pestivirus isolated was closely related to BVDV-1f. Apart from a single PI free-living eland (*Taurotragus oryx*), this was the first description of persistent infection and vertical transmission in a non-domestic ruminant species at that time.

The experimental schedule included daily clinical observations and weekly samplings of blood, nasal swabs, saliva and faeces under general anaesthesia. After an observational period of eighty-five days the PI animal was inoculated intranasally with $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml of the cp BVDV strain SH9/11. SH9/11 was formerly isolated from roe deer (*Capreolus capreolus*), classified as a BVDV-1c/-1d and antigenically partially matching the endogenous strain.

Until 125 days post superinfection no MD-like clinical symptoms were observed. However, regardless of nearly continuous shedding of the persistent ncp BVDV in body secretions and excretions, the cp BVDV strain was detected in isolated leukocytes on day 29 following superinfection, in the animal's faeces on days 29 and 35, in its nasal fluid on day 84 and in its saliva on days 70, 105, 112 and 125 after superinfection. Ejaculates, obtained by electroejaculation on days 7 and 125 following superinfection, were found positive for ncp BVDV. Whereas all blood samples taken before challenge reacted negatively in the virus neutralisation tests, neutralising antibodies against the inoculated cp BVDV strain were detected on days 35 and 42 following superinfection.

On day 125 post superinfection the study had to be aborted unforeseeingly, as the experimental animal had to be euthanised due to a severe, purulent periodontitis and osteitis. At postmortem neither macroscopic nor histologic MD-like lesions were noted. Specific RT-PCR detected the ncp BVDV strain in all tested organs of respiratory and digestive tract, urogenital and central nervous system, endocrinium, skin, lymphatic tissues, skeletal

SUMMARY

muscles and eye, whereas the cp superinfecting strain was found only in the salivary gland, rumen, abomasum, kidney and superficial prescapular lymph node. Via immunohistochemistry it was shown that the pattern of BVDV antigen within a tissue was consistent with that described for PI cattle earlier.

In conclusion, following superinfection with an antigenically partially matching BVDV strain the PI Lesser Mousedeer did not develop clinical signs or pathomorphologic lesions consistent with MD. Although low levels of specific antibodies against the superinfecting BVDV strain were detected, the experimental animal was not able to completely eliminate the superinfecting cp strain; thus, the occurrence of a late onset MD as demonstrated for cattle, cannot be excluded. On the other hand, results may also suggest a different course of BVDV infection in Lesser Mousedeer compared to cattle, as mousedeer might exhibit a dissimilar susceptibility towards the infectious agent. Considering the taxonomy of even-toed ungulates - while cattle and sheep, where MD respectively MD-like symptoms have been reported, are grouped within the infraorder Pecora of the suborder ruminantia, Lesser Mousedeer belong to the ancient infraorder Tragulinae. Its single family Tragulidae is said to be the phylogenetically earliest diverged taxon of ruminants, which might be a reason for a dissimilar cellular disposition of this species towards BVDV, facilitating persistent infection, thus a carrier status, and serologic response but preventing any BVDV-associated disease or development of MD.

A second objective of the present study was to evaluate whether the circulating BVDV-infection had an influence on the population decline of captive Lesser Mousedeer in European zoos. Analysing studbook and archived veterinary data could not exclude that BVDV may have predisposed individuals for mixed or secondary infections and may have played a role in the relatively high neonate mortality.

The presented study illustrates the importance of BVDV infections in captive wild artiodactyls. It is questionable, whether mousedeer will transmit BVDV directly to other zoo artiodactyls, but often the infrastructure of a zoological garden will allow indirect transmission to other susceptible species, some of which could possibly develop overt disease. A strict policy of hygiene, quarantine and screening tests including BVDV should be applied.

8. Literaturverzeichnis

- Abd El-Rahim IHA und Gründer HD (1996) Thrombozytopenie bei Rindern mit Mucosal Disease. Tierarztl Umsch 51, 470-478
- Agapov EV, Murray CL, Frolo I, Qu L, Myers TM, Rice CM (2004) Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. J Virol 78, 2414-2425
- Agungpriyono S, Atoji Y, Yamamoto Y, Zuki AB, Novelina S (2006) Morphology of the Intermandibular Gland of the Lesser Mouse Deer, *Tragulus javanicus*. Anat Histol Embryol 35, 325-333
- Agungpriyono S, Yamada J, Kitamura N, Nisa C, Sigit K, Yamamoto Y (1995a) Morphology of the dorsal lingual papillae in the Lesser Mouse Deer, *Tragulus javanicus*. J Anat 187, 635-640
- Agungpriyono S, Yamada J, Kitamura N, Sigit K, Yamamoto Y, Winarto A, Yamashita T (1995b) Light microscopic studies of the stomach of the Lesser Mouse Deer (*Tragulus javanicus*). Eur J Morphol 33, 59-70
- Agungpriyono S, Yamada J, Kitamura N, Yamamoto Y, Said N, Sigit K, Yamashita T (1994) Immunohistochemical study of the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the Lesser Mouse Deer (*Tragulus javanicus*). Acta Anat 151, 232-238
- Agungpriyono S, Yamamoto Y, Kitamura N, Yamada J, Sigit K, Yamashita T (1992) Morphological study on the stomach of the Lesser Mouse Deer (*Tragulus javanicus*) with special reference to the internal surface. J Vet Med Sci 54, 1063-1069
- Ahmad AH (1994) The ecology of mousedeer (*Tragulus* sp.) in a Bornean rainforest, Sabah, Malaysia. MPhil Thesis, Universiti Kebangsaan, Malaysia/University of Aberdeen, Scotland
- Ames TR (2005) Hosts. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. 1. Aufl. Blackwell Publishing, Oxford, 171-175
- Amtliche Methodensammlung (2008) Bekanntmachung der amtlichen Methodensammlung für die Untersuchung der Bovinen Virusdiarrhoe. Amtlicher Bundesanzeiger Nummer 169, 3999-4006
- Anderson EC und Rowe LW (1998) The prevalence of antibody to the viruses of bovine virus diarrhoea, bovine herpes virus 1, rift valley fever, ephemeral fever and bluetongue and to *Leptospira* sp in free-ranging wildlife in Zimbabwe. Epidemiol Infect 121, 441-449
- Anonymus (2004) EU Thematic network on control of bovine viral diarrhoea virus (BVDV), BVDV Control, QLRT – 2001-01573, Position paper
<http://www.bvdv-control.org>
- Anonymus (2008) Bovine Viral Diarrhoea. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008, 698-711
http://www.oie.int/eng/Normes/mmanual/A_00132.htm

- Ansari IH, Chen LM, Liang D, Gil LH, Zhong W, Donis RO (2004) Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. *J Virol* 78, 9612-9623
- Arnal MC, Fernández-de-Luco D, Riba L, Maley M, Gilray J, Willoughby K, Vilček S, Nettleton PF (2004) A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J Gen Virol* 85, 3653-3657
- Avalos-Ramirez R, Orlich M, Thiel HJ, Becher P (2001) Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286, 456-465
- Baigent SJ, Zhang G, Fray MD, Flick-Smith H, Goodbourn S, McCauley JW (2002) Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J Virol* 76, 8979-8988
- Baker JC (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 425-445
- Barlow RM, Gardiner AC, Nettleton PF (1983) The pathology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. *J Comp Pathol* 93, 451-461
- Barlow RM, Nettleton PF, Gardiner AC, Greig A, Campbell JR, Bonn JM (1986) Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in a bull. *Vet Rec* 118, 321-324
- Baronetzky-Mercier A (1995) Die Beurteilung hämatologischer Parameter. In: Göltenboth R und Klös HG (Hrsg.) *Krankheiten der Zoo und Wildtiere*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 12-14
- Barrette C (1987) The comparative behaviour and ecology of ehevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: Wemmer CM (Hrsg.) *Biology and Management of the Cervidae*. Smithsonian Institution Press, Washington, London, 200-213
- Becher P, Avalos-Ramirez R, Orlich M, Cedillo Rosales S, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeyer H, Thiel HJ (2003) Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implication for classification. *Virology* 311, 96-104
- Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M, Thiel HJ (1999) Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262, 64-71
- Becher P, Orlich M, Shannon A, Horner G, König M, Thiel HJ (1997) Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* 78, 1357-1366
- Becher P, Orlich M, Thiel H (2001) RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol* 75, 6256-6264
- Behrens SE, Grassmann CW, Thiel HJ, Meyers G, Tautz N (1998) Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* 72, 2364-2372
- Belknap EB, Collins JK, Larsen RS, Conrad KP (2000) Bovine viral diarrhea virus in new world camelids. *J Vet Diagn Invest* 12, 568-570

- Bielefeldt-Ohmann H (1984) An oculo-cerebellar syndrome caused by congenital bovine viral diarrhoea virus-infection. *Acta Vet Scand* 25, 36-49
- Bielefeldt-Ohmann H (1988a) BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease. *Acta Vet Scand* 29, 77-84
- Bielefeldt-Ohmann H (1988b) In situ characterization of mononuclear leukocytes in skin and digestive tract of persistently BVD virus-infected, clinically healthy calves and calves with Mucosal disease. *Vet Pathol* 25, 304-304
- Bielefeldt-Ohmann H (1995) The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection, a window on the pathogenesis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 447-475
- Bittle JL und House JA (1973) Comments on bovine viral diarrhoea vaccine reactions. *J Am Vet Med Assoc* 163, 879-879
- BmTierSSchV (1999) Verordnung über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung) in der Fassung vom 10. August 1999, zuletzt geändert durch Artikel 2 der Verordnung vom 17. Juli 2003, *Bundesgesetzblatt Teil I*, S. 1482
- Böck P (1989) Färbemethoden. In: Böck P (Hrsg.) *Romeis Mikroskopische Technik*. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- Bolin SR (1995) The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 489-500
- Bolin SR und Grooms DL (2004) Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20, 51-68
- Bolin SR, McClurkin AW, Coria MF (1985) Effects of bovine viral diarrhoea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B- and T-lymphocytes in cattle. *J Vet Res* 46, 884-886
- Bolin SR, McClurkin AW, Cutlip RC, Coria MF (1985a) Severe disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 46, 573-576
- Bolin SR, McClurkin AW, Cutlip RC, Coria MF (1985b) Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 46, 2467-2470
- Bolin S, Moennig V, Kelso Gourley NE, Ridpath J (1988) Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. *Arch Virol* 99, 117-123
- Bolin SR und Ridpath JF (1989) Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am J Vet Res* 50, 817-821

- Borel N, Janett F, Teankum K, Zlinsky K, Iten C, Hilbe M (2007) Testicular hypoplasia in a bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Comp Pathol* 137, 169-173
- Brackenbury LS, Carb BV, Stamataki Z, Prentice H, Lefevre EA, Howard CJ, Charleston B (2005) Identification of a cell population that produces alpha/beta interferon in vitro and in vivo in response to bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 79 7738-7744
- Brass W, Schulz LC, Überschar S (1966) Über das Auftreten „Mucosal Disease“-ähnlicher Erkrankungen bei Zoowiederkäuern. *Dtsch tierarztl Wochenschr* 73, 155-158
- Brendel T, Gerbermann H, Zenk A, Forster U, Kaaden OR, Wolf G (2005) Prävalenz und epidemiologische Gesichtspunkte der Bovinen Virusdiarrhöe Virus (BVDV)-Infektion in bayerischen Rinderherden. *Tierarztl Umsch* 60, 250-258
- Brock KV, Deng R, Riblet SM (1992) Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods* 38, 39-46
- Brock KV, Grooms DL, Givens MD (2005) Reproductive disease and persistent infections. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 145-156
- Brock KV, Grooms DL, Ridpath JF, Bolin SR (1998) Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 10, 22-26
- Brown GB, Boli SR, Frank DE, Roth JA (1991) Defective function of leukocytes from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, and the influence of recombinant cytokines. *Am J Vet Res* 52, 381-387
- Brownlie J (1990) Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 23, 371-382
- Brownlie J (1991) The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol Suppl* 3, 79-96
- Brownlie J und Clarke MC (1993) Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis. *Intervirology* 35, 51-59
- Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ (1984) Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec* 114, 535-536
- Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ, Pocock DH (1986) Mucosal Disease - the dilemma of of experimental disease. *Proc. 14th World Congr of Cattle Diseases, Dublin, Vol. 1*, 199-203
zit. nach: Brownlie J (1991) sowie Brownlie J und Clarke MC (1993)
- Bruschke CJ, Haghparast A, Hoek A, Rutten VP, Wentink GH, van Rijn PA, van Oirschot JT (1998) The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol* 62, 37-50
- Bürki F und Germann E (1964) Letale Pneumoenteritiden bei Kälbern, verursacht durch die Erreger der bovinen Virudiarrhoe. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 16, 324-326

- BVDV-Verordnung (2008) Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus und zur Änderung TSE-rechtlicher Verordnungen vom 11. Dezember 2008, Bundesgesetzblatt Jahrgang 2008 Teil I Nr. 59, S. 2461
- Byers SR, Snekvik KR, Righter DJ, Evermann DJ, Bradway DS, Parish SM, Barrington GM (2009) Disseminated bovine viral diarrhea virus in persistently infected alpaca (*Vicugna pacos*) cria. *J Vet Diagn Invest* 21, 145-148
- Carman S, Carr N, DeLay J, Baxi M, Deregt D, Hazlett M (2005) Bovine viral diarrhea virus in alpaca abortion and persistent infection. *J Vet Diagn Invest* 17, 589-593
- Charleston B, Brackenbury LS, Carr BV, Fray MD, Hope JC, Howard CJ, Morrison WI (2002) Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhea virus in vivo. *J Virol* 76, 923-927
- Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, Morrison WI (2001) Establishment of persistent infection with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol* 82, 1893-1897
- Chase CC, Braun LJ, Leslie-Steen P, Graham T, Miskimins D, Ridpath JF (2008) Bovine viral diarrhea virus multiorgan infection in two white-tailed deer in southeastern South Dakota. *J Wildl Dis* 44, 753-759
- Chase CCL, Elmowalid G, Yousif AAA (2004) The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20, 95-114
- Coen DM und Ramig RF (1996) Viral Genetics. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (Hrsg.) *Field's Virology*. 3. Aufl., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 113-151
- Collen T, Douglas AT, Paton DJ, Zhang G, Morrisoon WI (2000) Single amino acid differences are sufficient for CD4+ T-cell recognition of a heterologous virus by cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Virology* 276, 70-82
- Collins ME, Desport M, Brownlie J (1999) Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology* 259, 85-98
- Collett MS, Anderson DK, Retzel E (1988a) Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol* 69, 2637-2643
- Collett MS, Larson R, Berler SK, Retzel E (1988b) Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organisation of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208
- Collett MS, Larson R, Gold C, Strick D, Anderson DK, Purchio AF (1988c) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191-199
- Collett MS, Wiskerchen MA, Welniak E, Belzer SK (1991) Bovine viral diarrhea virus genomic organization. *Arch Virol Suppl* 3, 19-27

- Confer AW, Fulton RW, Step DL, Johnson BJ, Ridpath JF (2005) Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus subtype 2a. *Vet Pathol* 42, 192-199
- Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ (1990) Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 51, 1388-1394
- Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ (1988) Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *J Virol* 62, 2823-2827
- Coria MF und McClurkin AW (1978) Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* 172, 449-451
- Craig MI, Venzano A, König G, Morris WE, Jiménez L, Juliá S, Capellino F, Viera JB, Weber EL (2008) Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Res Vet Sci* 85, 194-196
- Dekker D und Schmidt C (1987) European Studbook for the Lesser Malayan Mouse Deer (*Tragulus javanicus*, Osbeck 1765), First Edition. Natura Artis Magistra, Amsterdam und Zooresearch Consultants, Utrecht
- Deregt D, Tessaro SV, Baxi MK, Berezowski J, Ellis JA, Wu JTY, Gilbert SA (2005) Isolation of bovine viral diarrhoea viruses from bison. *Vet Rec* 157, 448-450
- Desport M, Collins ME, Brownlie J (1998) Genome instability in BVDV: an examination of the sequence and structural influences on RNA recombination. *Virology* 246, 352-361
- Diaz R, Steen M, Reh binder C, Alenius S (1988) An outbreak of a disease in farmed fallow deer (*Dama dama*) resembling bovine virus diarrhoea/mucosal disease. *Acta vet Scand* 29, 369-376
- Doll K und Moennig V (2002) Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal-Disease-Komplex. In: Dirksen G, Gründer HD, Stöber M (Hrsg.) Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. 4. Aufl., Parey, Berlin, Wien, 572-581
- Donis RO, Corapi W, Dubovi EJ (1991) Bovine viral diarrhoea virus proteins and their antigenic analyses. *Arch Virol Suppl* 3, 29-40
- Doyle LG und Heuschele WP (1983) Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *J Am Vet Med Assoc* 183, 1257-1259
- Dubost G und Terrade R (1970) La transformation de la peau des Tragulidae en bouclier protecteur. *Mammalia* 34, 505-513
- Duncan C, Ridpath J, Palmer MV, Driskell E, Spraker T (2008) Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 20, 289-296

- Endo K, Kimura J, Sasaki M, Matsuzaki M, Matsubayashi H, Tanaka K, Fukuta K (2002) Functional morphology of the mastication muscles in the Lesser and Greater Mouse Deer. *J Vet Med Sci* 64, 901-905
- Evermann JF und Barrington GM (2005) Clinical Features. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 105-119
- Evermann JF, Berry ES, Baszler TV, Lewis TL, Byington TC, Dilbeck PM (1993) Diagnostic approaches for the detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus and related pestiviruses. *J Vet Diagn Invest* 5, 265-269
- Farida WA, Semiadi G, Handayani TH, Harun (2006) Habitat distribution and diversity of plants as feed resources for mouse deer (*Tragulus javanicus*) and barking deer (*Muntiacus muntjak*) in Gunung Halimun National Park. *Tropics* 15, 371-376
- Fay LD und Boyce AP (1955) A new disease of deer? Presented at the 17th Midwest Wildlife Conference
zit. nach: Richards SH, Schipper IA, Eveleth DF, Shumard RF (1956)
- Feinstein R, Rehbindler C, Rivera E, Nikkilä T, Stehen M (1987) Intracytoplasmatic inclusion bodies associated with vesicular, ulcerative and necrotizing lesions of the digestive mucosa of a roe deer (*Capreolus capreolus*) and a moose (*Alces alces L.*). *Acta Vet Scand* 28, 197-200
- Fernandez A, Hewicker M, Trautwein G, Pohlenz J, Liess B (1989) Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol* 26, 26-32
- Fernelius AL, Amtower WC, Lambert G, McClurkin AW, Matthews PJ (1973) Bovine viral diarrhoea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Can J Comp Med* 37, 13-20
- Fischer S, Weiland E, Frölich K (1998) Characterisation of a bovine viral diarrhoea virus isolated from roe deer in Germany. *J Wildl Dis* 34, 47-55
- Foster AP, Houlihan M, Higgins RJ, Errington J, Ibata G, Wakeley PR (2005) BVD virus in a British alpaca. *Vet Rec* 156, 718-719
- Foster AP, Houlihan MG, Holmes JP, Watt EJ, Higgins RJ, Errington J, Ibata G (2007) Bovine viral diarrhoea virus infection of alpacas (*Vicugna pacos*) in the UK. *Vet Rec* 161, 94-99
- Franchini M, Schweizer M, Mätzener P, Magkouras I, Sauter KS, Mirkovitch J, Peterhans E, Jungi TW (2006) Evidence for dissociation of TLR mRNA expression and TLR agonist-mediated functions in bovine macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 110, 37-49
- Fredriksen B, Press CM, Løken T, Ødegaard SA (1999) Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 64, 109-122

- Fray MD, Clarke MC, Thomas LH, McCauley JW, Charleston B (1998) Prolonged nasal shedding and viraemia of cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in experimental late-onset mucosal disease. *Vet Rec* 143, 608-611
- Fray MD, Supple EA, Morrison WI, Charleston B (2000) Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals. *J Gen Virol* 81, 1669-1673
- Frey HR und Liess B (1971) Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zentralbl Vet Med B* 18, 61-71
- Fricke J, Gunn M, Meyers G (2001) A family of closely related bovine viral diarrhoea virus recombinants identified in an animal suffering from mucosal disease: new insights into the development of a lethal disease in cattle. *Virology* 291, 77-90
- Fritzemeier J (1996) Früh- und Spätausbruch experimentell induzierter Mucosal Disease: Charakterisierung der beteiligten BVD-Viren. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Fritzemeier J, Greiser-Wilke I, Haas L, Pituco E, Moennig V, Liess B (1995) Experimentally induced "late-onset" mucosal disease--characterization of the cytopathogenic viruses isolated. *Vet Microbiol* 46, 285-294
- Fritzemeier J, Haas L, Liebler E, Moennig V, Greiser-Wilke I (1997) The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol* 142, 1335-1350
- Frölich K (1993) Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD) bei Cerviden in unterschiedlichen Freiland- und Gehegepopulationen: Seroepizootiologie und Virusisolierung. Dissertation, Freie Universität Berlin
- Frölich K (1995) Bovine virus diarrhoea and mucosal disease in free-ranging and captive deer (Cervidae) in Germany. *J Wildl Dis* 31, 247-250
- Frölich K und Hofmann M (1995) Isolation of Bovine Viral Diarrhoea Virus-like Pestiviruses from Roe Deer (*Capreolus capreolus*). *J Wildl Dis* 31, 243-246
- Frölich K, Jung S, Ludwig A, Lieckfeldt D, Gibert P, Gauthier D, Hars J (2005) Detection of a newly described pestivirus of Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in France. *J Wildl Dis* 41, 606-610
- Frölich K und Streich WJ (1998) Serologic evidence of bovine viral diarrhoea virus in free-ranging rabbits from Germany. *J Wildl Dis* 34, 173-178
- Fukuta K, Kudo H, Jalaludin S (1996) Unique pits on the erythrocytes of the Lesser Mouse Deer, *Tragulus javanicus*. *J Anat* 189, 211-213
- Fukuta K, Orui T, Tanaka K, Sasaki M, Endo H, Ismail DB, Kudo H, Kimura J (2007) Novel erythrocyte pits in the small tropical ruminant, Lesser Mouse Deer. *Anat Histol Embryol* 36, 424-427

- Fulton RW (2005) Vaccines. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. 1. Aufl. Blackwell Publishing, Oxford, 209-222
- Fulton RW, Step DL, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Johnson BJ, Briggs RE, Hawley RV, Burge LJ, Payton ME (2003) Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and *Mannheimia haemolytica* bacterin-toxoid. Vaccine 21, 2980-2985
- Fux R, Mossbrugger I, Wolf G (2008) Einflussfaktoren auf die Analyse diagnostischer Ohrstanzen. Nova Acta Leopoldina NF 95(350), 189-189
- Gallei A, Pankraz A, Thiel HJ, Becher P (2004) RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. J Virol 78, 6271-6281
- Gardiner AC, Nettleton PF, Barlow RM (1983) Virology and immunology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. J Comp Pathol 93, 463-469
- Gil LHV, Israrul HA, Ventzislav V, Liang D, Lai VCH, Zhong W, Hong Z, Dubovi E, Donis RO (2006) The amino-terminal domain of bovine viral diarrhoea virus N^{pro} protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. J Virol 80, 900-911
- Gillespie JH, Coggins L, Thompson J, Baker JA (1961) Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. Cornell Vet 51, 155-159
- Givens MD, Heath AM, Brock KV, Brodersen BW, Carson RL, Stringfellow DA (2003) Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. Am J Vet Res 64, 428-434
- Givens MD und Waldrop JG (2004) Bovine viral diarrhoea virus in embryo and semen production systems. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20, 21-38
- Göltenboth R (1995) Die medikamentöse Immobilisation der Zoo- und Wildtiere. In: Göltenboth R und Klös HG (Hrsg.) Krankheiten der Zoo und Wildtiere. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 3-8
- Goyal SM (2005) Diagnosis. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 197-208
- Goyal SM, Bouljihad M, Haugerud S, Ridpath JF (2002) Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. J Vet Diagn Invest 14, 523-525
- Grooms DL (2004) Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20, 5-19
- Grooms D, Baker JC, Ames TR (2002) Diseases caused by bovine virus diarrhoea virus. In: Smith BP (Hrsg.) Large Animal Internal Medicine. 3. Aufl. Mosby, St. Louis, MO, 707-714
- Grooms DL, Kaiser L, Walz PH, Baker JC (2001) Study of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus that lack detectable virus in serum. J Am Vet Med Assoc 219, 629-631

- Grøndahl C, Uttenthal A, Houe H, Rasmussen TB, Hoyer MJ, Larsen LE (2003a) Characterisation of a pestivirus isolated from persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*). Arch Virol 148, 1455-1463
- Grøndahl C, Uttenthal A, Houe H, Rasmussen TB, Hoyer MJ, Larsen LE (2003b) Detection of persistent infection with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in a mousedeer (*Tragulus javanicus*) and experimental transmission to cattle. Verhber Erkrz Zootiere 41, 25-27
- Grubb P (1993) Family Tragulidae. In: Wilson DE und Reeder DM (Hrsg.) Mammal Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference. 2. Aufl. Bd. 1, Smithsonian Institution Press, Washington D.C., 382-383
- Grubb P (2005) Family Tragulidae. In: Wilson DE und Reeder DM (Hrsg.) Mammal Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference. 3. Aufl. Bd. 1, Johns Hopkins University Press, Baltimore, 648-650
- Grummer B, Beer M, Liebler-Tenorio E, Greiser-Wilke I (2001) Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. J Gen Virol 82, 2597-2605
- Grummer B, Bendfeldt S, Greiser-Wilke I (2002a) Apoptosis inhibitors delay the cytopathic effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). J Vet Med B 49, 298-303
- Grummer B, Bendfeldt S, Wagner B, Greiser-Wilke I (2002b) Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. Virus Res 90, 143-153
- Grummer B, Grotha S, Greiser-Wilke I (2004) Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. J Vet Med B 51, 427-432
- Grummer B, Moennig V, Greiser-Wilke I (1998) Cytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses induce apoptosis in bovine cell cultures. Dtsch Tierarztl Wochenschr 105, 29-31
- Guenther SE (1954) An epizootic among white tailed deer, unpublished, Washington Departement of game
zit. nach: Richards SH, Schipper IA, Eveleth DF, Shumard RF (1956)
- Gunn HM (1993) Role of fomites and flies in transmission of bovine viral diarrhoea virus. Vet Rec 132, 584-585
- Gunn M und Weavers E (1992) Mucosal disease in cattle housed in isolation. Vet Rec 131, 376-376
- Haas B (2001) Die Diagnostik der Maul- und Klauenseuche. Dtsch Tierarztl Wochenschr 108, 508-513
- Haas L und Moennig V (2008) Impfmaßnahmen im Rahmen der BVD/MD- Bekämpfung. Nova Acta Leopoldina NF 95(350), 73-77
- Haines DM, Clark EG, Dubovi EJ (1992) Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Vet Pathol 29, 27-32

- Harasawa R, Ayoma F, Goryo M, Okada K, Nishimura T, Matsubara K, Tsujimoto T, Giangaspero M (2006) Evidence for pestivirus infection in free-living Japanese Serow, *Capricornis crispus*. *Microbiol Immunol* 50, 817-821
- Harasawa R, Giangaspero M, Ibata G, Paton DJ (2000) Giraffe strain of pestivirus: its taxonomic status based on the 5'-untranslated region. *Microbiol Immunol* 44, 915-921
- Harkness JW, Roeder PL, Wood L (1984) Mucosal Disease in cattle. *Vet Rec* 115, 186-186
- Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moormann JM, Rice CM, Thiel HJ (2000) Family Flaviviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Hrsg.) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 859-878
- Hendrichs H und Frey R (2003) Artiodactyla (Paraxonia), Paarhufer. In: Westheide W und Rieger R (Hrsg.) *Spezielle Zoologie, Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere*. Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, 608-630
- Hernández Fernández M und Vrba ES (2005) A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. *Biol Rev* 80, 269-302
- Hilbe M, Ossent P, Zlinszky K, Ehrensperger F (2000) Abnormal bone development associated with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infection in a newborn calf. *Europ J Vet Pathol* 6, 115-119
- Hilbe M, Stalder H, Peterhans E, Haessig M, Nussbaumer M, Egli C, Schelp C, Zlinszky K, Ehrensperger F (2007) Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J Vet Diagn Invest* 19, 28-34
- Hilbe M, Zlinszky K, Ehrensperger F (2008) Der immunhistochemische Nachweis von BVD-Virusinfektionen an Hautbiopsien. *Nova Acta Leopoldina NF* 95(350), 97-102
- Hildebrandt TB, Hermes R, Jewgenow K, Göritz F (2000) Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species. *Theriogenology* 53, 73-84
- Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, Chen YH, Randall RE, McCauley JW, Goodbourn S (2006) The Npro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteosomal degradation. *J Virol* 80, 11723-11732
- Hoff HS und Donis RO (1997) Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res* 49, 101-113
- Hofmann RR (2007) *Wildtiere in Bildern zur vergleichenden Anatomie*. Verlag M&H Schaper, Hannover
- Hofmann MA, Brechtbühl K, Stäuber N (1994) Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch Virol* 139, 217-229

- Hoyer MJ, van Maanen C, Grøndahl C (2003) Persistent infections with BVD virus in a population of Lesser Mousedeer (*Tragulus javanicus*) in the ARTIS Zoo, Amsterdam. *Verhber Erkrz Zootiere* 41, 21-23
- Hoyer MJ (2005) Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*): an update on continuing joint international research. *Verhber Erkrz Zootiere* 42, 92-93
- Houe H (1995) Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 521-547
- Houe H (2005) Risk assessment. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. 1. Aufl. Blackwell Publishing, Oxford, 35-64
- Howard CJ, Brownlie J, Clarke MC (1987) Comparison by neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol* 13, 361-369
- Huffmann B (2007) *Neotragus pygmaeus*, Royal antelope
http://www.ultimateungulate.com/Artiodactyla/Neotragus_pygmaeus.html
- Hulst MM und Moormann RJM (2001) Erns protein of pestiviruses. *Meth Enzymol* 342, 431-440
- Hurtado A, Aduriz G, Gómez N, Oporto B, Juste RA, Lavin S, Lopez-Olvera JR, Marco I (2004) Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J Wildl Dis* 40, 796-800
- Husbandry Manual Lesser Mousedeer (*Tragulus javanicus*-group), Second Edition. Semrau A, Verstappen F, Wolters M, Szánthó J, Hoyer M. European Association of Zoos and Aquaria (Hrsg.), Amsterdam, 2010
http://www.eaza.net/member_area/TAGs/Deer
- Hyndmann DL und Mitsuhashi M (2003) PCR Primer Design. In: Bartlett JMS und Stirling D (Hrsg.) *Methods in Molecular Biology: PCR Protocols*. 2. Aufl. Bd. 226, Humana Press, Totowa, New Jersey, 81-88
- Iqbal M und McCauley JW (2002) Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E(rns) of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. *J Gen Virol* 83, 2153-2159
- Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, McCauley JW (2004) Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol* 78, 136-145
- IUCN (2009) *Red List of Threatened Species 2009*. Version 2009.2.
<http://www.iucnredlist.org>
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002) *Immunologie*. 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg, Berlin

- Janis C (1984) Tragulids as Living Fossils. In: Eldredge N und Stanley SM (Hrsg.) Living Fossils. Springer Verlag, New York, 87-94
- Jeffrey M und Roeder PL (1987) Variabel nature of Border disease on a single farm: clinical and pathological description of affected sheep. Res Vet Sci 43, 22-27
- Johnson DW und Muscoplat CC (1973) Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhea. Am J Vet Res 34, 1139-1141
- Jones ML (1993) Longevity of ungulates in captivity. Int Zoo Yearb 32, 159-169
- Jordan R, Wang L, Graczyk TM, Block TM, Romano PR (2002) Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmatic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. J Virol 76, 9588-9599
- Kameyama K, Sakoda Y, Tamai K, Nagai M, Akashi H, Kida H (2006) Genetic recombination at different points in the Npro-coding region of bovine viral diarrhea viruses and the potentials to change their antigenicities and pathogenicities. Virus Res 116, 78-84
- Kamis AB, Nordin M, Zubaid A (1994) A review of the biology of Lesser Mouse Deer, *Tragulus javanicus*, from Malaysia. Sains Malaysiana 23, 1-8
- Kapil S, Walz P, Wilkerson M, Minocha H (2005) Immunity and Immunosuppression. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control. 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 157-170
- Karasov C (2003) Chevrotains (*Tragulidae*). In: Hutchins M, Kleiman DG, Geist V, McDade MC (Hrsg.) Grzimek's Animal Life Encyclopedia. 2. Aufl. Bd. 15 Mammals IV, Farmington Hills, MI, Gale Group, 325-334
- Karstad LH (1981) Bovine virus diarrhea. In: Davis JW, Karstad LH, Trainer DO (Hrsg.) Infectious diseases of wild mammals. Iowa State Press, Ames, Iowa, 209-211
- Kast A und Kraus M (1968) MKS-Impfung als auslösender Faktor einer latenten Mucosal Disease im Zoo. Verhber Erkrz Zootiere 10, 175-179
- Kimura J, Sasaki M, Endo H, Fukuta K (2004): Anatomical and histological characterization of the female reproductive organs of mouse deer (*Tragulidae*). Placenta 25, 705-711
- Kirkland PD, Mackintosh SG, Moyle A (1994) The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. Vet Rec 135, 527-529
- Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Stanley DF (1991) Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. Vet Rec 128, 587-590
- Kraft W (1999) Hämatologie. In: Kraft W und Dürr UM (Hrsg.) Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 5. Aufl., Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 43-77
- Krey T, Himmelreich A, Heimann M, Menge C, Thiel HJ, Maurer K, Rümenapf T (2006) Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1. J Virol 80, 3912-3922

- Krey T, Thiel HJ, Rügenapf T (2005) Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J Virol* 79, 4191-4200
- Kudo H, Fukuta K, Imai S, Dahlan I, Abdullah N, Ho HW, Jalaludin S (1997) Establishment of Lesser Mouse Deer (*Tragulus javanicus*) colony for use as a new laboratory animal and/or companion animal: 1. behaviour; 2. hematological characteristics; 3. reproductive physiology; 4. rumen microbiology in relation to feed digestibility; and 5. metabolic activities. *JIRCAS J* 4, 79-88
- Kudo H, Imai S, Jalaludin S, Fukuta K, Cheng KJ (1995) Ruminants and rumen microorganisms in tropical countries. In: Wallace RJ und Lahlou-Kassi A (Hrsg.) *Rumen ecology research planning. Proceedings of a workshop held at Addis Ababa, Ethiopia 1995.* International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenya, 70-94
- Kulcsár G, Soós P, Kucsera L, Glávits R, Pálfi V (2001) Pathogenicity of a bovine viral diarrhoea virus strain in pregnant sows: short communication. *Acta Vet Hung* 49, 117-120
- Lackner T, Müller A, König M, Thiel HJ, Tautz N (2005) Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol* 79, 9746-9755
- Lackner T, Müller A, Pankraz A, Becher P, Thiel HJ, Gorbalenya AE, Tautz N (2004) Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol* 78, 10765-10775
- Lai MMC (1992) RNA Recombination in Animal and Plant Viruses. *Microbiol Rev* 56, 61-79
- Lambot M, Hanon E, Lecomte C, Hamers C, Letesson JJ, Pastoret PP (1998) Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependant on monocytes. *J Gen Virol* 79, 1745-1749
- Larson RL (2005) Management systems and control programs. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control.* 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 223-238
- Larsson B (1988) Increased suppressor cell activity in cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *J Vet Med B* 35, 271-279
- Larsson B, Tråvén M, Hultén C, Hård af Segerstad C, Belák K, Alenius S (1995) Serum concentrations of thyroid hormones in calves with a transient or persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Res Vet Sci* 58, 186-189
- Lazar C, Zitzmann N, Dwek RA, Branza-Nichita N (2003) The pestivirus E(rns) glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology* 314, 696-705
- Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouille Y (2005) Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 79, 10826-10829
- Lee SR, Nanduri B, Pharr GT, Stoles JV, Pinchuk LM (2009) Bovine viral diarrhoea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes. *Biochim Biophys Acta* 1794, 14-22

- Lee SR, Pharr GT, Boyd BL, Pinchuk LM (2008) Bovine viral diarrhea viruses modulate toll-like receptors, cytokines and co-stimulatory molecules genes expression in bovine peripheral blood monocytes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31, 403-418
- Liang D, Sainz IF, Ansari IH, Gil LHVG, Vassilev V, Donis RO (2003) The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J Gen Virol* 84, 1269-1274
- Liebler EM, Küsters C, Pohlenz JF (1995) Experimental mucosal disease in cattle: changes of lymphocyte subpopulations in Peyer's patches and in lymphoid nodules of large intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 48, 233-248
- Liebler EM, Küsters C, Pohlenz JF (1996) Experimental mucosal disease in cattle: changes in the number of lymphocytes and plasma cells in the mucosa of the small and large intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 55, 93-105
- Liebler EM, Waschbüsch J, Pohlenz JF, Moennig V, Liess B (1991) Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol Suppl* 3, 109-124
- Liebler-Tenorio EM (2005) Pathogenesis. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) *Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control*. 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 121-143
- Liebler-Tenorio EM, Greiser-Wilke I, Pohlenz J (1997) Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch Virol* 142, 1613-1634
- Liebler-Tenorio EM, Lanwehr A, Greiser-Wilke I, Loehr BI, Pohlenz J (2000) Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet Microbiol* 77, 163-174
- Liebler-Tenorio EM und Pohlenz JF (1997) Experimental mucosal disease of cattle: changes in cell proliferation in lymphoid tissues and intestinal epithelium. *J Comp Pathol* 117, 339-350
- Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD (2004) Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest* 16, 388-396
- Liess B, Frey HR, Kittsteiner H, Baumann F, Neumann W (1974) Beobachtungen und Untersuchungen über die "Mucosal Disease" des Rindes - einer immunbiologisch erklärbare Spätform der BVD-MD-Virusinfektion mit Kriterien einer "slow virus infection"? *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 81, 481-487
- Liess B, Frey HR, Orban S, Hafez SM (1983) Bovine Virudiarrhoe (BVD) – "Mucosal Disease": Persistente BVD-Feldvirusinfektion bei serologisch selektierten Rindern. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 90, 261-266

- Liess B, Orban S, Frey HR, Trautwein G, Wiefel W, Blindow H (1984) Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). *Zbl Vet Med B* 31, 669-681
- Loehr BI (1997) Untersuchungen zur Pathogenese der Früh- und Spätform der *Mucosal Disease*. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Loehr BI, Frey HR, Moennig V, Greiser-Wilke I (1998) Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Arch Virol* 143, 667-679
- Løken T (1995a) Border Disease in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 579-595
- Løken T (1995b) Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 597-614
- Løken T und Bjerkås I (1991) Experimental pestivirus infections in pregnant goats. *J Comp Pathol* 105, 123-140
- Loneragan GH, Thomson DU, Montgomery DL, Mason GL, Larson RL (2005) Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 226, 595-601
- Lorenz R (1992) Beschreibende Statistik. In: Lorenz R und Vollmar J (Hrsg.) *Grundbegriffe der Biometrie*. 3. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 27-67
- Ludwig und McClurkin (1981) BVD in a Minnesota white-tailed deer. *Wildl Dis Assoc Mtg Abstracts*, 38-38
zit. nach: Ames TR (2005)
- Mars MH, Brusckhe CJM, van Oirschot JT (1999) Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Microbiol* 66, 197-207
- Mätzener P, Magkouras I, Rümenapf T, Peterhans E, Schweizer M (2009) The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. *Virus Res* 140, 15-23
- Magkouras I, Mätzener P, Rümenapf T, Peterhans E, Schweizer M (2008) RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by E^{rns} of pestiviruses. *J Gen Virol* 89, 2501-2506
- Malmquist WA (1968) Bovine viral diarrhoea-mucosal disease: etiology, pathogenesis and applied immunity. *J Am Vet Med Assoc* 152, 763-770
- Martucciello A, De Mia GM, Giammarioli M, De Donato I, Iovane G, Galiero G (2009) Detection of bovine viral diarrhoea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *J Vet Diagn Invest* 21, 137-140
- Matsubayashi H, Bosi E, Kohshima S (2003) Activity and habitat use of Lesser Mousedeer (*Tragulus javanicus*). *J Mammal* 84, 234-242

- Matsubayashi H, Bosi E, Kohshima S (2006) Social system of the Lesser Mousedeer (*Tragulus javanicus*). *Mamm Study* 31, 111-114
- Matsubayashi H and Sukor JRA (2005) Activity and habitat use of two sympatric mouse-deer species, *Tragulus javanicus* and *Tragulus napu*, in Sabah, Malaysia, Borneo. *Malay Nat J* 57, 235-241
- Mattson DE, Baker RJ, Catania JEC, Imbur SR, Wellejus KM, Bell RB (2006) Persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in an alpaca. *J Am Vet Med Assoc* 228, 1762-1765
- Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel HJ, Rümenapf T (2004) CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 78, 1792-1799
- McKercher DG, Saito JK, Crenshaw GL, Bushnell RB (1968) Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhoea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 152, 1621-1624
- McClurkin AW, Bolin SR, Coria MF (1985) Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc* 186, 568-569
- McClurkin AW, Coria MF, Cutlip RC (1979) Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* 174, 1116-1119
- McClurkin AW, Littledike ET, Cutlip RC, Frank GH, Coria MF, Bolin SR (1984) Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can J Comp Med* 48, 156-161
- McMartin DA, Snodgrass DR, Corrigan W (1977) Bovine virus diarrhoea antibody in a Scottish red deer. *Vet Rec* 100, 187
- Meijaard E und Groves CP (2004) A taxonomic revision of the *Tragulus* mouse-deer (Artiodactyla). *Zool J Linn Soc* 140, 63-102
- Meijaard E und Sheil D (2008) The persistence and conservation of Borneo's mammals in lowland rain forests managed for timber: observations, overviews and opportunities. *Ecol Res* 23, 21-34
- Meijaard E, Sheil D, Nasi R, Augeri D, Rosenbaum B, Iskanda D, Setyawati T, Lammertink M, Rachmatika I, Wong A, Soehartono T, Stanley S, O'Brien T (2005) *Life After Logging: Reconciling Wildlife Conservation in Indonesian Borneo*. CIFOR and UNESCO, Bogor, Indonesia
- Metais G, Chaimanee Y, Jaeger JJ, Ducrocq S (2001) New remains of primitive ruminants from Thailand: evidence of the early evolution of the Ruminantia in Asia. *Zool Scr* 30, 231-248
- Meyling A und Jensen AM (1988) Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently infected bull. *Vet Microbiol* 17, 97-105

- Mishra N, Vilcek S, Rajukumar K, Dubey R, Tiwari A, Galav V, Pradhan HK (2008) Identification of bovine viral diarrhoea virus type 1 in yaks (*Bos poepagus grunniens*) in the Himalayan region. *Res Vet Sci* 84, 507-510
- Miura S und Idris AH (1999) Present status and group size of the mouse-deer on Pulau Tioman, Malaysia. *Malay Nat J* 53, 335-339
- Miura S, Yasuda M, Ratnam LC (1997) Who steals the fruits? Monitoring frugivory of mammals in a tropical rain forest. *Malay Nat J* 50, 183-193
- Moennig V, Bolin SR, Coulibaly COZ, Kelso Gourley NE., Liess B, Mateo A, Peters W, Greiser-Wilke I (1987) Untersuchungen zur Antigenstruktur von Pestiviren mit Hilfe monoklonaler Antikörper. *Dtsch tierarztl Wochenschr* 94, 572-576
- Moennig V, Frey HR, Liebler E, Pohlenz J, Liess B (1990) Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet Rec* 127, 200-203
- Moennig V, Greiser-Wilke I, Frey HR, Haas L, Liebler E, Pohlenz J, Liess B (1993) Prolonged persistence of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus in a persistently viremic cattle. *J Vet Med B* 40, 371-377
- Moennig V und Liess B (1995) Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 477-487
- Möstl K, Krametter-Frötscher R, Loitsch A, Kohler H, Schleiner A, Schiefer P, Baumgartner W (2008) Zum Wirtsspektrum von Pestiviren. *Nova Acta Leopoldina NF* 95(350), 63-68
- Mohd TBO (1976) Classical and Modern Malay Literature. In: Brill EJ (Hrsg.) *Literaturen, Abschnitt 1. Tuta Sub Aegide Pallas* EJB, Leiden/Köln, 123-123
- Monies RJ, Paton DJ, Vilček S (2004) Mucosal disease-like lesions in sheep infected with Border disease virus. *Vet Rec* 155, 765-769
- Montgomery DL (2007) Distribution and cellular heterogeneity of bovine viral diarrhoea viral antigen expression in the brain of persistently infected calves: a new perspective. *Vet Pathol* 44, 643-654
- Montgomery DL, van Olphen A, van Campen H, Hansen TR (2008) The fetal brain in bovine viral diarrhoea virus-infected calves: lesions, distribution, and cellular heterogeneity of viral antigen at 190 days gestation. *Vet Pathol* 45, 288-296
- Morton JK, Evermann JF, Dietrich RA (1990) Experimental infection of reindeer with bovine viral diarrhoea virus. *Rangifer* 10, 75-77
- Munday BL (1972) A serological study of some infectious disease of Tasmania wildlife. *J Wildl Dis* 8, 169-175
- Muñoz-Zanzi CA, Hietala SK, Thurmond MC, Johnson WO (2003) Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. *Am J Vet Res* 64, 358-365
- Murondoti A, van der Kolk JH, van der Linde-Sipmann JS (1999) Type I diabetes mellitus in a pregnant heifer persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec* 144, 268-269

- Murray CL, Marcotrigiano J, Rice CM (2008) Bovine viral diarrhoea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J Virol* 82, 1294-1304
- Nagai M, Sakoda Y, Mori M, Hayashi M, Kida H, Akashi H (2003) Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 84, 447-452
- Nakajima N, Fukuyama S, Hirahara T, Takamura K, Okada N, Kawazu K, Ui S, Kodama K (1993) Induction of mucosal disease in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *J Vet Med Sci* 55, 67-72
- National Research Council (1991) *Microlivestock: Little-Known Small Animals with a Promising Economic Future*. National Academy Press, Washington D.C.
<http://www.nap.edu/openbook/030904295X/html/R1.html>
- Neill JD (2005) Interactions of virus and host. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 177-195
- Nelson DD, Dark MJ, Bradway DS, Ridpath JF, Call N, Haruna J, Rurangirwa FR, Evermann JF (2008) Evidence for persistent bovine viral diarrhoea virus infection in a captive mountain goat. *J Vet Diagn Invest* 20, 752-759
- Nettleton PF (1990) Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech* 9, 131-150
- Nettleton PF, Gilray JA, Russo P, Dlissi E (1998) Border disease of sheep and goats. *Vet Res* 29, 327-340
- Nettleton PF, Gilmour JS, Herrin, JA, Sinclair JA (1992) The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 15, 179-188
- Nettleton PF, Herring JA, Corrigan W (1980) Isolation of bovine virus diarrhoea virus from Scottish red deer. *Vet Rec* 107, 425-426
- Neumann W, Buitkamp J, Bechmann G, Plöger W (1980) BVD/MD- Infektion bei einem Damhirsch. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 87, 94-94
- Niskanen R und Lindberg A (2003) Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air and from contaminated pens. *Vet J* 165, 125-130
- Njaa BL, Clark EG, Janzen E, Ellis JA, Haines DM (2000) Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagn Invest* 12, 393-399
- Noll S und Schaub-Kuhnen S (2000) Nachweismethoden. In: Höfler H und Müller KM (Hrsg.) *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München, Jena

- Nowak RM (1999) Order Artiodactyla. In: Walker EP (Hrsg.) Walker's Mammals of the World. 6. Aufl., Johns Hopkins University Press, London, 1051-1238
- Olafson P, McCallum AD, Fox FH (1946) An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36, 205-213
- Orr MB und Roe AR (1993) A mucosal disease-like condition in lambs with hairy shaker disease. *N Z Vet J* 41, 152
- Passler T, Walz PH, Ditchkoff SS, Givens MD, Maxwell HS, Brock KV (2007) Experimental persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in white-tailed deer. *Vet Microbiol* 122, 350-356
- Passler T, Walz PH, Ditchkoff SS, Brock KV, Deyoung RW, Foley AM, Givens DM (2009) Cohabitation of pregnant white-tailed deer and cattle persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus results in persistently infected fawns. *Vet Microbiol* 134, 362-367
- Passler T, Walz PH, Ditchkoff SS, Walz HL, Givens MD, Brock KV (2008) Evaluation of hunter-harvested white-tailed deer for evidence of bovine viral diarrhoea virus infection in Alabama. *J Vet Diagn Invest* 20, 79-82
- Paton DJ, Lowings JP, Barrett AD (1992) Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 190, 763-772 (erratum in: *Virology* 191, 1013-1013)
- Peek SF, Bonds MD, Schaele P, Weber S, Friedrichs K, Schultz RD (2004) Evaluation of antiviral activity and toxicity of recombinant human interferon alfa-2a in calves persistently infected with type 1 bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 65, 865-870
- Peter CP, Tyler DE, Ramsey FK (1967) Characterization of a condition following vaccination with bovine virus diarrhoea vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 150, 46-52
- Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M (2003) BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31, 107-111
- Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M (2006) Wie das Bovine Virusdiarrhoe-Virus das Immunsystem überlistet. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 113, 124-129
- Peterhans E, Mätzener P, Magkouras I, Stalder H, Jungi T, Schweizer M (2008) BVD-Virus: Umgehung der angeborenen Immunabwehr als Voraussetzung für Immuntoleranz und Viruspersistenz. *Nova Acta Leopoldina NF* 95(350), 49-59
- Peters JC (1966) Mucosal Disease im Rotterdamer Zoologischen Garten. *Verber Erkrgr Zootiere* 7, 329-333
- Piccinini R, Luzzago C, Frigerio M, Daprà V, Liandris E, Zecconi A (2006) Comparison of blood non-specific immune parameters in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) persistently infected and in immune heifers. *J Vet Med B* 53, 62-67
- Pinchuk G, Lee SR, Nanduri B, Honsinger KL, Stoles JV, Pinchuk LM (2008) Bovine viral diarrhoea viruses differentially alter the expression of the protein kinases and related proteins affecting the development of infection and anti-viral mechanisms in bovine monocytes. *Biochim Biophys Acta* 1784, 1234-1247

- Pizarro-Lucero J, Celedón MO, Navarro C, Ortega R, González D (2005) Identification of a pestivirus isolated from a free-ranging pudu (*Pudu pudu*) in Chile. *Vet Rec* 157, 292-294
- Plowright W (1969) Other virus diseases in relation to the JP15 programme. In: Joint campaign against rinderpest, Proceedings of the first technical review meeting, phase IV, Mogadiscio, Organization of African Unity, Kenya, 19-23
zit. nach: Vilček S und Nettleton PF (2006)
- Potgieter LND (1995) Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 501-520
- Proganichniy RM, Raizman E, Thacker HL, Stevenson GW (2008) Prevalence and characterization of bovine viral diarrhoea virus in the white-tailed deer population in Indiana. *J Vet Diagn Invest* 20, 71-74
- Qu L, McMullan LK, Rice CM (2001) Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural proteins NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol* 75, 10651-10662
- Ralls K (1976) Mammals in which females are larger than males. *Q Rev Biol* 51, 245-276
- Ramsey FK und Chivers WH (1953) Mucosal disease of cattle. *N Am Vet* 34, 629-633
- Ramsey FK und Chivers WH (1957) Pathology of a mucosal disease of cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 381-383
- Rehbinder C, Gimeno E, Belak K, Stehen M, Rivera E, Nikkilä T (1991) A bovine viral diarrhoea/mucosal disease-like syndrome in moose (*Alces alces*): investigations on the central nervous system. *Vet Rec* 129, 552-554
- Revell SG, Chasey D, Drew TW, Edwards S (1988) Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec* 123, 122-125
- Rice CM (1996) Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (Hrsg.) *Field's Virology*. 3. Aufl., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 931-959
- Richards SH, Schipper IA, Eveleth DF, Shumard RF (1956) Mucosal Disease of deer. *Vet Med* 51, 358-362
- Richtlinie 92/65/EWG (a) (1992) Richtlinie über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen für den Handel mit Tieren, Samen, Eizellen und Embryonen in der Gemeinschaft sowie für ihre Einfuhr in die Gemeinschaft, soweit sie diesbezüglich nicht den spezifischen Gemeinschaftsregelungen nach Anhang A Abschnitt I der Richtlinie 90/425/EWG unterliegen. *Amtsblatt der Europäischen Union* Nr. L 268 vom 14.09.1992, S. 54
- Ridpath JF (2003) BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control. *Biologicals* 31, 127-132
- Ridpath JF (2005) Classification and molecular biology. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 65-80

- Ridpath JF und Bolin SR (1995) Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotyp 2 BVDV. *Virology* 212, 259-262
- Ridpath JF und Bolin SR (1998) Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes* 12, 101-106
- Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205, 66-74
- Ridpath JF, Lewis TL, Bolin SR, Berry ES (1991) Antigenic and genomic comparison between non-cytopathic and cytopathic bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle that had spontaneous mucosal disease. *J Gen Virol* 72, 725-729
- Ridpath JF, Mark SC, Chase CCL, Ridpath AC, Neill JD (2007) Febrile response and decrease in circulating lymphocytes following acute infection of white-tailed deer fawns with either a BVDV1 or a BVDV2 strain. *J Wildl Dis* 43, 653-659
- Ridpath JF, Neill JD, Vilcek S, Dubovi EJ, Carman S (2006) Multiple outbreaks of severe acute BVD in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet Microbiol* 114, 96-204
- Roberts DH, Lucas MH, Wibberley G, Westcott D (1988) Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leukosis virus. *Vet Rec* 122, 293-296
- Robin NP (1979) Zum Verhalten des Kleinkantschils (*Tragulus javanicus* Osbeck 1765). Dissertation, Universität Zurich
- Robin K (1988) Hirschferkel. In: Grzimek B (Hrsg.) Grzimeks Enzyklopädie Säugetiere. Bd. 5., Kindler Verlag, München, 120-123
- Roeder PL und Drew TW (1984) Mucosal Disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Vet. Rec* 114, 309-313
- Roeder PL, Jeffrey M, Cranwell MP (1986) Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation. *Vet Rec* 118, 44-48
- Roeder PL, Jeffrey M, Drew TW (1987) Variabel nature of Border disease on a single farm: the infection status of affected sheep. *Res Vet Sci* 43, 28-33
- Romvary J (1965) Incidence of virus diarrhoea among roes. *Acta Vet Hung* 15, 451-455
- Rosner SF (1968) Complications following vaccination of cattle against infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhoea-mucosal disease, and parainfluenza type 3. *J Am Vet Med Ass* 152, 898-902
- Roth JA, Bolin SR, Frank DE (1986) Lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 47, 1139-1141
- Rümenapf T und Krey T (2008) Frühe Schritte der BVDV-Invasion in die Wirtszelle. *Nova Acta Leopoldina NF* 95(350), 37-47

- Rümenapf T und Thiel HJ (2008) Molecular Biology of Pestiviruses. In: Mettenleiter TC und Sobrino F (Hrsg.) Animal Viruses, Molecular Biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 39-96
- Rümenapf T, Unger G, Strauss R, Meyers G, Thiel HJ (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. J Virol 67, 3288-3294
- Scheibner HM (2000) Methoden zur Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) zum Virusgenomnachweis mittels Polymerasekettenreaktion nach Reverser Transkription (RT-PCR). Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Schellner HP (1977) Untersuchungsergebnis von Fallwild und anderen ausgewählten Tierarten von 1973 bis 1976 in Bayern. Tierarztl Umsch 32, 225-228
- Scherer CF, Flores EF, Weiblen R, Caron L, Irigoyen LF, Neves JP, Maciel MN (2001) Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. Vet Microbiol 79, 285-299
- Schirrmeyer H, Strebelow G, Depner K, Hoffmann B, Beer M (2004) Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. J Gen Virol 85, 3647-3652
- Schneider R, Unger G, Stark R, Schneider-Scherzer E, Thiel HJ (1993) Identification of a structural glycoprotein on an RNA Virus as a ribonuclease. Science 261, 1169-1171
- Schröder HD (1985) Beitrag zu den Infektionskrankheiten der Cerviden. Verhber Erkrq Zootiere 27, 51-54
- Schröder HD und Ippen R (1973) Beitrag zu den virusbedingten und bakteriellen Erkrankungen der Zoowiederkäuer. Verhber Erkrq Zootiere 15, 35-40
- Schulz LC (1959) Pathologisch-anatomische Befunde bei der sogenannten ‚Mucosal Disease‘ (Schleimhautkrankheit) des Rindes. Dtsch Tierarztl Wochenschr 66, 586-588
- Schweizer M, Mätzener P, Pfaffen G, Stalder HP, Peterhans E (2006) "Self" and "Nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. J Virol 80, 6926-6935
- Schweizer M und Peterhans E (2001) Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. J Virol 75, 4692-4698
- Sentsui H, Nishimori T, Kirisawa R, Morooka A (2001) Mucosal disease induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus by antigenically different cytopathic virus. Arch Virol 146, 993-1006
- Shimizu M, Satou K, Nishioka N, Yoshino T, Momotani E, Ishikawa Y (1989) Serological characterization of viruses isolated from experimental mucosal disease. Vet Microbiol 19, 13-21
- Shin T und Acland H (2001) Tissue distribution of bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected cattle. J Vet Sci 2, 81-84

- Shope RE, Macnamara LG, Mangold R (1955) Deer mortality/ epizootic hemorrhagic disease of deer. N Y Outdoors 6, 16-16
 zit. nach: Richards SH, Schipper IA, Eveleth DF, Shumard RF (1956)
- Smit-van Dort M (1989) Skin, skull and skeleton characters of mouse deer (Mammalia, *Tragulidae*) with keys to the species. Bulletin Zoölogisch Museum, Universiteit van Amsterdam 12, 89-96
- Soma H (2004) Malay Chevrotain (Lesser Mouse Deer) *Tragulus javanicus*.
<http://placentation.ucsd.edu/indxf.html>
- Sosnowski A (1977) Infektionskrankheiten im zoologischen Garten Lodz in den Jahren 1961 bis 1975. Verhber Erkrz Zootiere 19, 147-151
- Spearman R und Kärber G (1985) Das Virus als Partikel. In: Horzinek MC (Hrsg.) Kompendium der allgemeinen Virologie. 2. Aufl., Paul Parey, Berlin, 22-23
- Starck D (1995) Artiodactyla (Paraxonia). In: Lehrbuch der Speziellen Zoologie, begründet von A. Kaestner. Bd. 2, Teil 5/2, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 975-1026
- Steck F, Lazary S, Frey H, Wandeler A, Huggler C, Oppliger G, Baumberger H, Kaderli R, Martig J (1980) Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine viral diarrhoea-mucosal disease. Zbl Vet Med B 27, 429-445
- Steger G (1973) Untersuchungsergebnisse an 1500 Objekten aus der Gruppe wildlebender Wiederkäuer. Verhber Erkrz Zootiere 15, 25-34
- Stewart WC, Miller LD, Kresse JI, Snyder ML (1980) Bovine viral diarrhoea infection in pregnant swine. Am J Vet Res 41, 459-462
- St. Louis MC, Massie B, Archambault D (2005) The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. Vet Res 36, 213-227
- Stöber M (1959) Die klinische Seite der sogenannten ‚Mucosal Disease‘ (Schleimhautkrankheit) des Rindes. Dtsch Tierarztl Wochenschr 66, 582-586
- Stokstad M und Løken T (2002) Pestivirus in cattle: experimentally induced persistent infection in calves. J Vet Med B 49, 494-501
- Strawder N (2000) *Tragulus javanicus*. Animal Diversity Web.
http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Tragulus_javanicus.html
- Swasdipan S, McGowan M, Phillips N, Bielefeldt-Ohmann H (2002) Pathogenesis of transplacental virus infection: pestivirus replication in the placenta and fetus following respiratory infection. Micro Pathol 32, 49-60
- Szunyoghy A und Fehér G (1996) Grand cours d'anatomie artistique. Homme, animaux, anatomie comparée. Könemann Verlagsgesellschaft mbH Köln, 493-493
- Tajima M (2004) Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. Vet Microbiol 99, 131-138

- Tajima M, Frey HF, Yamato O, Maede Y, Moennig V, Scholz H, Greiser-Wilke I (2001) Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res* 76, 31-42
- Tajima M, Yazawa T, Hagiwara K, Kurosawa T, Takahashi K (1992) Diabetes mellitus in cattle infected with bovine viral diarrhoea mucosal disease virus. *J Vet Med Assoc* 39, 616-620
- Tajima M, Yuasa M, Kawanabe M, Taniyama H, Yamato O, Maede Y (1999) Possible causes of diabetes mellitus in cattle infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Med B* 46, 207-216
- Tamura JK, Warrener P, Collett MS (1993) RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 193, 1-10
- Taniyama H, Ushiki T, Tajima M, Kurosawa N, Kitamura K, Takahashi K, Matsukawa K, Itakura C (1995) Spontaneous diabetes mellitus associated with persistent bovine viral diarrhoea (BVD) virus infection in young cattle. *Vet Pathol* 32, 221-229
- Taniyama H, Hirayama K, Kagawa Y, Ushiki T, Kurosawa T, Furuoka H, Ono T (1999) Immunohistochemical demonstration of bovine viral diarrhoea virus antigen in the pancreatic islet cells of cattle with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Comp Pathol* 121, 149-157
- Tarry DW, Bernal L, Edwards S (1991) Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet Rec* 128, 82-84
- Tautz N, Elbers K, Stoll D, Meyers G, Thiel HJ (1997) Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol* 71, 5415-5422
- Tautz N, Kaiser A, Thiel HJ (2000) NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease cofactor interactions. *Virology* 273, 351-363
- Tautz N, Thiel HJ, Dubovi EJ, Meyers G (1994) Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol* 68, 3289-3297
- Teichmann U, Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JF (2000) Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am J Vet Res* 61, 174-182
- Tera S, Endo H, Rerkamnuaychoke W, Hondo E, Agungpriyono S, Kitamura N, Kurohmaru M, Kimura J, Hayashi Y, Nishida T, Yamada J (1998) An osteometrical study of the cranium and mandible of the Lesser Mouse Deer. *J Vet Med Sci* 60, 1097-1105
- Terpstra C und Wensvoort G (1988) Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res Vet Sci* 45, 137-142
- Terpstra C und Wensvoort G (1991) Bovine virus diarrhoea virus infections in swine. *Tijdschr Diergeneeskd* 116, 943-948

- Terpstra C und Wensvoort G (1997) A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: clinical, virological and immunological observations. *Vet Q* 19, 97-101
- Tessaro SV, Carman PS, Deregt D (1999) Viremia and virus shedding in elk infected with type 1 and virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus. *J Wildl Dis* 35, 671-677
- Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, Purcell RH, Rice A (2005) Family Flaviviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Hrsg.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 979-969
- Thiel HJ, Plagemann PGW, Moennig V (1996) Pestiviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (Hrsg.) *Field's Virology. 3. Aufl., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1059-1073*
- Thomson RG und Savan M (1963) Studies on virus diarrhoea and mucosal disease of cattle. *Canad J Comp Med Vet Sci* 27, 207-214
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 15, 4876-4882
- Thrusfield M (2005) *Veterinary epidemiology. 3. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, UK*
- Thür B, Caplazi P, Hilbe M, Zlinsky K, Strasser M, Corboz L, Ehrensperger F (1998) Pestivirus as causative agent of abortion and perinatal mortality in cattle and sheep in Switzerland. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 105, 145-148
- Thür B, Hilbe M, Strasser M, Ehrensperger F (1997) Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am J Vet Res* 58, 1371-1375
- Thür B, Zlinsky K, Ehrensperger F (1996) Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. *J Vet Med Series B* 43, 163-166
- Thurmond MC (2005) *Virus Transmission. In: Goyal SM und Ridpath JF (Hrsg.) Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. 1. Aufl., Blackwell Publishing, Oxford, 91-104*
- TierSchG (1998) *Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. Mai 1998, Bundesgesetzblatt Teil I, S. 1106, zuletzt geändert durch die Verordnung vom 25. November 2003, Bundesgesetzblatt Teil I, S. 2003-2304*
- TierSG (2004) *Tierseuchengesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004, Bundesgesetzblatt Teil I, Seite 1260, 3588, zuletzt geändert durch Artikel 1 § 5 Abs. 3 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007, Bundesgesetzblatt Teil I, S. 2930*

- Uttenthal Å, Grøndahl C, Hoyer MJ, Houe H, Van Maanen C, Rasmussen TB, Larsen LE (2005) Persistent infection in mousedeer infects calves - do we know the reservoirs for BVDV? *Prev Vet Med* 72, 87-91
- Uttenthal Å, Hoyer MJ, Grøndahl C, Houe H, van Maanen C, Rasmussen TB, Larsen LE (2006) Vertical transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in mousedeer (*Tragulus javanicus*) and spread to domestic cattle. *Arch Virol* 151, 2377-2387
- Van Campen H, Frölich K, Hofmann M (2001) Pestivirus infections. In: Williams ES, Barker IK (Hrsg.) *Infectious diseases of wild mammals*. Manson Publishing/Veterinary Press, London, 232-237
- Van Campen H, Ridpath J, Williams E, Cavender J, Edwards J, Smith S, Sawyer H (2001) Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J Wildl Dis* 37, 306-311
- Van Campen H, Williams ES, Edwards J, Cook W, Stout G (1997) Experimental infection of deer with bovine viral diarrhoea virus. *J Wildl Dis* 33, 567-573
- Vidyadaran MK, Hilmi M, Sirimane RA (1979) Haematological studies on the Malaysian Lesser Mouse-deer (*Tragulus javanicus*). *Pertanika* 2, 101-104
- Vidyadaran MK, Hilmi M, Sirimane RA (1981) Dentition of Malaysian Lesser Mousedeer (*Tragulus javanicus*). *Pertanika* 4, 47-52
- Vidyadaran MK, Hilmi M, Sirimane RA (1982) The gross morphology of the stomach of the Malaysian Lesser Mousedeer (*Tragulus javanicus*). *Pertanika* 5, 34-38
- Vidyadaran MK, Panandam JM, Ismail H (1994) Weights of parotid and mandibular glands of the Lesser Malaysian Mousedeer (*Tragulus javanicus*). *J Vet Malay* 6, 29-32
- Vidyadaran MK, Sharma RSK, Sumita S, Zulkifli I, Razeem-Mazlan A (1999) Male genital organs and accessory glands of the Lesser Mouse Deer, *Tragulus javanicus*. *J Mammal* 80, 199-204
- Vilček S, Ďurkovič B, Kolesárová M, Greiser-Wilke I, Paton DJ (2004) Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet Res* 35, 609-615
- Vilček S, Ďurkovič B, Kolesárová M, Paton DJ (2005a) Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med* 72, 31-35 und 215-219
- Vilček S und Nettleton PF (2006) Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol* 116, 1-12
- Vilček S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmannith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V (2001) Bovine viral diarrhoea virus genotypes can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 146, 99-115
- Vilček S, Paton DJ, Rowe LW, Anderson EC (2000) Typing of pestiviruses from eland in Zimbabwe. *J Wildl Dis* 36, 165-168

- Vilček S, Ridpath JF, Van Campen H, Cavender JL, Warg J (2005b) Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res* 108, 187-193
- Voges H, Horner GW, Rowe S, Wellenberg GJ (1998) Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet Microbiol* 61, 165-175
- Voss HJ (1959) Beobachtungen über die Schleimhautkrankheit (Mucosal Disease) der Rinder in Deutschland. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 66, 149-151
- Wallach JD and Boever WJ (1983) *Diseases of Exotic Animals, Medical and Surgical Management*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, 205-205
- Walz PH, Baker JC, Mullaney TP, Kaneene JB, Maes RK (1999) Comparison of type I and type II bovine viral diarrhoea virus infection in swine. *Can J Vet Res* 63, 119-123
- Walz, PH, Baker JC, Mullaney TP, Maes RK (2004) Experimental inoculation of pregnant swine with type 1 bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 191-193
- Walz PH, Bell TG, Wells JL, Grooms DL, Kaiser L, Maes RK, Baker JC (2001) Relationship between degree of viremia and disease manifestations in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. *Am J Vet Res* 62, 1095-1103
- Warrener P und Collett MS (1995) Pestivirus NS3 (p80) possesses RNA helicase activity. *J Virol* 69, 1720-1726
- Warrilow D, Lott WB, Greive S, Gowans EJ (2000) Properties of the bovine viral diarrhoea virus replicase in extracts of infected MDBK cells. *Arch Virol* 145, 2163-2171
- Weber KH, Hürter KP, Commichau C (1982) Über das Vorkommen des Virusdiarrhoe/Mucosal Disease Virus bei Cerviden in Rheinland-Pfalz. *Dtsch. Tierarztl Wochenschr* 89, 1-3
- Weidenmüller H (1971) Fallwilduntersuchung 1950-1970. *Tierarztl Umsch* 26, 201-203
- Weiland E, Stark R, Haas B, Rümenapf T, Meyers G, Thiel HJ (1990) Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J Virol* 64, 3563-3569
- Weiss E (1999) Harnorgane. In: Dahme E und Weiss E (Hrsg.) *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. 5. Aufl., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 243-277
- Wemmer C und West J (1982) The dermal shield of the Lesser Mouse Deer. *Malay Nat J* 36, 137-139
- Wentz PA, Belknap EB, Brock KV, Collins JK, Pugh DG (2003) Evaluation of bovine viral diarrhoea virus in new world camelids. *J Am Vet Med Assoc* 223, 223-228

- Westenbrink F, Straver PJ, Kimman TG, de Leeuw PW (1989) Development of a neutralising antibody response to an inoculated cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* 125, 262-265
- Wilhelmsen CL, Bolin SR, Ridpath JF, Chevillie NF, Kluge JP (1991) Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea. *Am J Vet Res* 52, 269-275
- Windisch JM, Schneider R, Stark R, Weiland E, Meyers G, Thiel HJ (1996) RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* 70, 352-358
- Wiskerchen M, Belzer SK, Collett MS (1991) Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* 65, 4508-4514
- Wolf G (2008) BVDV-Antigen und -Antikörper in Blut und Gewebe. *Nova Acta Leopoldina NF* 95(350), 79-81
- Yousif AA, Braun LJ, El-Lei TAA et al. (1998) Sequence analysis of a type II cytopathic BVDV of Dromedary camels. *Proc Conf Res Workers Anim Dis* 79, 113
zit. nach: Belknap EB, Collins JK, Larsen RS, Conrad KP (2000)
- Yu H, Isken O, Grassmann CW, Behrens SE (2000) A stem-loop motif formed by the immediated 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol* 74, 5825-5835
- Zhang G, Aldridge S, Clarke C, McCauley JW (1996) Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol* 77, 1677-1681
- Zhong W, Gutshall LL, Del Vecchio AM (1998) Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 72, 9365-9369

9. Anhang

9.1 Protokolle zu verwendeten Lösungen (in alphabetischer Reihenfolge)

dNTP - Stammlösung (25mM)

| | | |
|------|--------|---|
| | 25 µl | dATP, 100 mM |
| | 25 µl | dCTP, 100 mM |
| | 25 µl | cGTP, 100 mM |
| | 25 µl | cTTP, 100 mM (alle IBM Fermentas GmbH, St- Leon-Rot, D) |
| → ad | 300 µl | steriles Wasser |

dNTP - Stammlösung (10mM)

| | | |
|------|--------|---|
| | 10 µl | dATP, 100 mM |
| | 10 µl | dCTP, 100 mM |
| | 10 µl | cGTP, 100 mM |
| | 10 µl | cTTP, 100 mM (alle IBM Fermentas GmbH, St- Leon-Rot, D) |
| → ad | 360 µl | steriles Wasser |

0,5 M EDTA Lösung, pH 8

| | | |
|------|----------|---------------------------------|
| | 186,12 g | EDTA (Merck KgaA, Darmstadt, D) |
| → ad | 1000 ml | Aqua dest |

Eosin, 0,2 %ig, angesäuert

| | | |
|------|--------|--|
| | 0,2 g | Eosin (Merck KgaA, Darmstadt, D) |
| | 1 Tr. | Eisessig (Rotipuran [®] 100%, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| → ad | 100 ml | Aqua dest. |

Ethidiumbromid - Stammlösung

| | | |
|------|--------|--|
| | 0,5 g | Ethidiumbromid (10 mg/ml) (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| → ad | 100 ml | Aqua dest. |

Für ein Ethidiumbromidbad 3 Tropfen der Stammlösung in 400 ml 1x TAE-Elektrophoresepuffer geben.

Formaldehydlösung, 4 %ig, neutralgepuffert

Phosphatpuffer Lsg. A

| | | |
|------|--------|---|
| | 2,72 g | Kaliumdihydrogenphosphat (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| → ad | 200 ml | Aqua dest. |

Phosphatpuffer Lsg. B

| | | |
|------|---------|--|
| | 14,24 g | Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| → ad | 800 ml | Aqua dest. |

Lösungen mischen.

| | | |
|------|---------|--|
| | 40 g | Paraformaldehyd (Merck KgaA, Darmstadt, D) |
| → ad | 1000 ml | Phosphatpuffer Lsg. A und B und unter Erhitzen auflösen. |

Hämalaun nach MAYER (Böck, 1989)

| | | |
|------|---------|---|
| | 1 g | Hämatoxylin (Merck KgaA, Darmstadt, D) |
| | 0,2 g | Natriumjodat (Merck KgaA, Darmstadt, D) |
| | 50 g | Kaliumaluminiumsulfat (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) |
| | 50 g | Chloralhydrat (Merck KgaA, Darmstadt, D) |
| | 1 g | Zitronensäure (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| → ad | 1000 ml | Aqua dest. |

Lösung vor Gebrauch filtrieren.

Natriumchloridlösung, 0,2 %ig und 7,2 %ig

| | | |
|------|----------------|---|
| | 0,2 bzw. 7,2 g | Natriumchlorid (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| → ad | 100 ml | Aqua dest. |

Natriumchloridlösung, phosphatgepuffert (PBS) (0,05 M, pH 7,4)

| | | |
|------|---------|---|
| | 8 g | Natriumchlorid |
| | 0,2 g | Kaliumchlorid |
| | 0,2 g | Kaliumdihydrogenphosphat |
| | 1,4 g | Natriumdihydrogenphosphat (alle Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| → ad | 1000 ml | Aqua dest. |

TAE, 50x - Stammlösung

| | | |
|------|---------|---|
| | 242 g | Tris Base (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| | 57,1 ml | Essigsäure (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D) |
| | 200 ml | 0,5 M EDTA Lösung pH 8 |
| → ad | 1000 ml | Aqua dest. |

Für 1x TAE die Stammlösung im Verhältnis 49:1 mit Aqua dest. verdünnen.

9.2 Diät

Die täglich angebotene *ad libitum* Ration umfaßte:

25 g Primacon[®]-Pellets (Arie Blok BV, Woerden, Niederlande), 25 g „Parrot“ Seed Mix[®] (Witte Molen BV, Meeuwen, Niederlande), 15 g getrocknetes, zerkleinertes Johannisbrot, 40 g geschälte, zerkleinerte Bananen, 130 g zerkleinerte Äpfel, 55 g zerkleinerte Mohrrüben, 30 g Endiviensalat, 15 g eines hausgemachten Mixes aus Fischpellets, Trockenmilch, Salz, Ei, Vitamin A und D3 sowie B-Vitaminen (Artis Royal Zoo, Amsterdam), eine Prise Farmix AD3 Prills[®] (Truw Nutrition Nederland BV, La Putten, Niederlande) und eine Prise Gistocal[®] (Beaphar Nederland BV, Hedel, Niederlande)

9.3 Untersuchungsprotokolle

Tagesprotokoll

| | | |
|------------------------------------|---|---------|
| Datum, Uhrzeit | | |
| Raumtemperatur, Luftfeuchte | °C | % |
| Futteraufnahme | <input type="checkbox"/> ja: v.a. <input type="checkbox"/> nein | |
| Wasseraufnahme | <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | |
| Kotabsatz | <input type="checkbox"/> ja: Konsistenz ... Farbe ... Beimengungen ... <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | |
| Harnabsatz | <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | |
| Bewußtsein | <input type="checkbox"/> aufmerksam <input type="checkbox"/> träge <input type="checkbox"/> teilnahmslos <input type="checkbox"/> schläfrig <input type="checkbox"/> komatisch <input type="checkbox"/> andere: | |
| Verhalten | <input type="checkbox"/> ausgeglichen <input type="checkbox"/> unruhig <input type="checkbox"/> ängstlich <input type="checkbox"/> aggressiv <input type="checkbox"/> zwanghaft <input type="checkbox"/> andere: | |
| Haltung | <input type="checkbox"/> sitzend <input type="checkbox"/> liegend <input type="checkbox"/> stehend <input type="checkbox"/> gekrümmt <input type="checkbox"/> gestreckter Hals <input type="checkbox"/> andere: | |
| Gang | <input type="checkbox"/> obB* <input type="checkbox"/> steif <input type="checkbox"/> lahm <input type="checkbox"/> kraftlos <input type="checkbox"/> unkoordiniert <input type="checkbox"/> andere: | |
| Ernährungszustand | <input type="checkbox"/> adipös <input type="checkbox"/> gut <input type="checkbox"/> mäßig <input type="checkbox"/> schlecht | |
| Haut, Haarkleid | <input type="checkbox"/> obB* Haarkleid: <input type="checkbox"/> stumpf <input type="checkbox"/> kahle Stellen <input type="checkbox"/> andere: Haut: <input type="checkbox"/> Verletzung <input type="checkbox"/> Farbveränderung <input type="checkbox"/> andere: | |
| Atmung | <input type="checkbox"/> obB* Tiefe/Rhythmus: <input type="checkbox"/> oberflächlich <input type="checkbox"/> unregelmäßig <input type="checkbox"/> tief Atemtyp: <input type="checkbox"/> costal <input type="checkbox"/> abdominal <input type="checkbox"/> pendelnd <input type="checkbox"/> andere: | |
| Sonstiges | | |
| Behandlungen, Eingriffe | | |

*obB: ohne besonderen Befund

Protokoll zur wöchentlichen Untersuchung unter Inhalationsnarkose

| | | | |
|---|--|---|---|
| Datum | | | |
| <p style="text-align: center;">Narkose</p> Allgemeinzustand Dokumentation Einleitung Erhaltung Aufwachen Komplikationen | | ASA I II III IV V <u>Dosis</u> <u>Uhrzeit</u> | |
| <p style="text-align: center;">Klinische Untersuchung</p> Allgemein, v.a. Rektaltemperatur Körpermasse Lymphknoten Hautturgor Herz-, Kreislaufsystem, v.a. KFZ Schleimhautfarbe Herzauskultation Puls Atmungstrakt, v.a. Nasenöffnungen Atemfrequenz Auskultation Verdauungstrakt, v.a. Maulhöhle Pansen Anus Haut / Haarkleid, v.a. Präputium Zwischklauenspalt / Kronsaum Sonstiges | | | |
| Proben | ... ml EDTA-Blut <input type="checkbox"/> Nasentupfer | ... ml Citratblut <input type="checkbox"/> Speichelprobe | <input type="checkbox"/> Blutausstrich <input type="checkbox"/> Kotprobe |

9.4 Tabellarische Übersicht zu den *ante* (Tage -84 bis 0) und *post* (Tage 7 bis 125) *infectionem* entnommenen Proben (Tag 0: Tag der experimentellen Infektion; +: Probe entnommen, -: Probe nicht entnommen)

| Tag | EDTA Blut | Blut- ausstrich | Plasma | Leuko- zyten- isolat | Nasen- tupfer | Speichel- tupfer | Kot- probe |
|------|-----------|--------------------|--------|----------------------------|------------------|---------------------|---------------|
| - 84 | - | - | + | + | - | - | + |
| - 79 | + | + | + | + | - | - | + |
| - 75 | - | - | + | + | - | - | + |
| - 70 | + | + | + | + | - | - | + |
| - 64 | + | + | + | + | - | - | - |
| - 57 | + | + | + | + | - | - | + |
| - 51 | - | - | + | + | - | - | + |
| - 41 | + | + | + | + | - | - | - |
| - 35 | - | - | + | + | + | + | + |
| - 28 | + | + | + | + | + | + | + |
| - 21 | + | + | + | + | + | + | + |
| - 14 | + | + | + | + | + | + | - |
| - 7 | + | + | + | + | + | + | + |
| 0 | + | + | - | - | - | - | - |
| 7* | + | + | + | + | + | + | + |
| 14 | + | + | + | + | + | + | + |
| 21 | + | + | + | + | + | + | + |
| 29 | + | + | + | + | + | + | + |
| 35 | + | + | + | + | + | + | + |
| 42 | + | + | + | + | + | + | + |
| 49 | + | + | + | + | + | + | + |
| 56 | + | + | + | - | + | + | + |
| 63 | + | + | + | + | + | + | + |
| 70 | + | + | + | + | + | + | + |
| 77 | + | + | + | + | + | + | + |
| 84 | + | + | + | + | + | + | + |
| 93 | + | + | + | + | + | + | + |
| 98 | + | + | + | + | + | + | + |
| 105 | + | + | + | + | + | + | + |
| 112 | + | + | + | + | + | + | + |
| 119 | - | - | - | - | - | - | + |
| 125* | + | + | + | + | + | + | + |

*An den Tagen 7 und 125 *p.i.* wurde zudem **Ejakulat** gewonnen.

9.5 Kenngrößen zu Lage und Streuung der klinischen Parameter Körpermasse und Rektaltemperatur sowie zum weissen Blutbild (Gesamtleukozytenzahl, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten) *ante* (Tage -79 bis 0) und *post infectionem* (Tage 7 bis 125)

x_{max} : Maximalwert, x_{min} : Minimalwert, R: Spannweite, $x_{0,25}$: 1. Quartil, $x_{0,5}$: 2. Quartil oder Median, $x_{0,75}$: 3. Quartil, \bar{x} : arithmetisches Mittel, s: Standardabweichung, Vk: Variationskoeffizient, n: Zahl der Messwerte (Abkürzungen nach Lorenz, 1992)

| Körpermasse (g) | vor | nach |
|-----------------|---------------------------|-------|
| | experimenteller Infektion | |
| x_{max} | 1810 | 1770 |
| x_{min} | 1680 | 1660 |
| R | 130 | 110 |
| $x_{0,25}$ | 1705 | 1710 |
| $x_{0,5}$ | 1760 | 1730 |
| $x_{0,75}$ | 1780 | 1750 |
| \bar{x} | ~1748 | ~1726 |
| s | 45,1 | 26,5 |
| Vk % | ~2,6 | ~1,5 |
| n | 14 | 17 |

| Rektaltemperatur (°C) | vor | nach |
|-----------------------|---------------------------|------|
| | experimenteller Infektion | |
| x_{max} | 39,2 | 40,1 |
| x_{min} | 37,8 | 37,8 |
| R | 1,4 | 2,3 |
| $x_{0,25}$ | 38,2 | 38,0 |
| $x_{0,5}$ | 38,5 | 38,5 |
| $x_{0,75}$ | 38,5 | 38,6 |
| \bar{x} | 38,4 | 38,5 |
| s | 0,36 | 0,63 |
| Vk % | ~1 | ~1,6 |
| n | 14 | 17 |

ANHANG

| | vor | | nach | |
|-----------------------------------|---------------------------|------------|--------------|------------|
| | experimenteller Infektion | | | |
| Gesamtleukozytenzahl (G/l) | | | | |
| X _{max} | 5,2 | | 10,5 | |
| X _{min} | 2,5 | | 2,85 | |
| R | 2,7 | | 7,65 | |
| X _{0,25} | 3,5 | | 3,3 | |
| X _{0,5} | 4,05 | | 4,17 | |
| X _{0,75} | 4,6 | | 5 | |
| \bar{x} | 4 | | 4,6 | |
| s | 0,87 | | 1,87 | |
| Vk% | ~22 | | ~41 | |
| n | 10 | | 17 | |
| Lymphozyten | | | | |
| | (G/l) | (%) | (G/l) | (%) |
| X _{max} | 4,42 | 90 | 7,67 | 91 |
| X _{min} | 2,05 | 74 | 2,35 | 73 |
| R | 2,37 | 16 | 5,32 | 18 |
| X _{0,25} | 2,82 | 80,5 | 2,67 | 78 |
| X _{0,5} | 3,28 | 85 | 3,55 | 79 |
| X _{0,75} | 4,1 | 85,75 | 3,95 | 83 |
| \bar{x} | 3,34 | 82,9 | 3,64 | 80,2 |
| s | 0,84 | 4,93 | 1,3 | 4,85 |
| Vk% | ~25 | ~6 | ~36 | ~6 |
| n | 10 | 10 | 17 | 17 |
| neutrophile Granulozyten | | | | |
| | (G/l) | (%) | (G/l) | (%) |
| X _{max} | 0,88 | 22 | 2,84 | 27 |
| X _{min} | 0,39 | 8 | 0,26 | 9 |
| R | 0,49 | 14 | 2,58 | 18 |
| X _{0,25} | 0,56 | 14 | 0,6 | 17 |
| X _{0,5} | 0,59 | 14,5 | 0,82 | 19 |
| X _{0,75} | 0,68 | 16,75 | 0,99 | 21 |
| \bar{x} | 0,6 | 15,4 | 0,9 | 18,5 |
| s | 0,15 | 4,01 | 0,6 | 4,37 |
| Vk% | 25 | ~26 | 66 | ~24 |
| n | 10 | 10 | 17 | 17 |

Verzeichnis der Publikationen

Aufsätze und Monografien

- Husbandry Manual Lesser Mousedeer (*Tragulus javanicus*-group) Semrau A, Verstappen F, Wolters M, Szánthó J, Hoyer M. European Association of Zoos and Aquaria (Ed.) Executive Office Amsterdam, 2010, http://www.eaza.net/member_area/TAGs/Deer
- Semrau A, Wibbelt G, Hilbe M, Lieckfeldt D, Hermes R, Müller KE, Heckert HP, Hoyer MJ, Frölich K (2008) Experimental superinfection of a Lesser Malayan mousedeer (*Tragulus javanicus*) persistently infected with Bovine viral diarrhea virus. J Zoo Wildl Med 39, 124-127
- Wolters S, Semrau A, Hoyer M (2007) Nocturnal animals in zoos - to keep or not to keep. Verhber Erkrz Zootiere 43, 192-196

Posterpräsentationen

- Semrau A, Wibbelt G, Kík M, Hoyer MJ (2008) Causes of Death in Captive Lesser Malayan mousedeer (*Tragulus javanicus*). In: Erken AHM (Ed.) European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians (EAZWV), Proceedings of the meeting held at Leipzig/Germany, April 30 - May 3, 423-423
- Semrau A, Wibbelt G, Hilbe M, Lieckfeldt D, Hermes R, Müller KE, Heckert HP, Hoyer MJ, Frölich K (2006) Experimental superinfection of a Lesser Malayan mousedeer (*Tragulus javanicus*) persistently infected with Bovine viral diarrhea virus. In: Erken AHM (Ed.): European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians (EAZWV), Proceedings of the meeting held at Budapest/Hungary, May 24 - 28, 309-310

Vortrag

- Antje Semrau, Frank Verstappen, Marno Wolters, Janosh Szantho, Mark Hoyer (2008) The Lesser Mousedeer: Status Quo of Husbandry and Management in European Zoos. 25th EAZA (European Association of Zoos and Aquaria) Annual Conference, September 16 - 20, Antwerp/Belgium

Mein herzlicher Dank sei ausgesprochen an ...

- ... Prof. Dr. H. Hofer für die Übernahme und engagierte Betreuung der Arbeit in ihrer Endphase
- ... PD Dr. Dr. K. Frölich für die Überlassung des Projektes der experimentellen Superinfektion und die Bereitstellung von Arbeitsplatz und -materialien
- ... Dr. G. Wibbelt für ihre zuverlässige Betreuung und konstruktive Kritik sowie die schönen Gespräche und lustigen Stunden
- ... K. Hönig für ihre geduldige Einweisung in die Laborarbeit, ihre freundliche Unterstützung und die jederzeit gewährte fachliche Hilfe
- ... Dr. M. Hilbe für ihr Interesse an der BVD/MD bei Kleinkantschilen und die gute, ermutigende Zusammenarbeit
- ... D. Lieckfeldt für seine geduldige Unterweisung im Umgang mit den kleinen Bausteinen A, G, C, T, ...
- ... B. Peters und C. Greulich für ihre Unermüdlichkeit beim Aufstöbern auch „exotischer“ Publikationen
- ... K. Pohle, D. Viertel, M. Biering, D. Krumnow und Z. Mezö für ihre Hilfestellung bei tausend kleinen Fragen
- ... Dr. Wolf und die Tierpfleger des Bundesinstituts für Risikobewertung für die Möglichkeit der Unterbringung und vor allem die ebenso aufmerksame wie liebevolle Versorgung des Kleinkantschils
- ... Prof. Dr. K. E. Müller und Dr. H. P. Heckert sowie ihre Mitarbeiterinnen Frau Waberowski und Frau Lamprecht für ihre Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung des Versuchs
- ... Prof. Dr. K. Eulenberger für sein Interesse an Kleinkantschilen
- ... Dr. T. B. Hildebrandt, Dr. F. Göritz, Dr. R. Hermes und Frau A. Krause für die großzügige Bereitstellung des Inhalationsnarkosegerätes nebst Zubehör
- ... Dr. R. Hermes für die sachkundige Ejakulatentnahme
- ... Dr. S. Speck und N. Jahn für die mikrobiologische Untersuchung
- ... Dr. R. Stark für seinen Humor
- ... E. Radtke und A. Willing für die gute Zusammenarbeit
- ... K. Goller und M. Fassbender für ihre freundschaftliche Präsenz
- ... M. Hoyer, M. Wolters, F. Verstappen, D. Valk, sowie M. und J. Versloot für die erfahrungsreichen, schönen Monate im Artis Royal Zoo, Natura Artis Magistra
- ... die Zuchtbuchkoordinatoren M. van Hees und J. Szánthó für die Bereitstellung von Hintergrundinformationen sowie
- ... die Tierseuchenforschungsförderung, die Pfizer GmbH und die Virbac Tierarzneimittel GmbH für die Bewilligung von Sachmitteln.

Traditionell am Schluss, aber von ganzem Herzen, möchte ich meinen Dank an meine Familie richten, der ich diese Arbeit widme.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 1. August 2010

Antje Semrau