

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt

*„Erarbeitung wissenschaftlich basierter Empfehlungen für die
Vorgehensweise bei Wiedereinschleppung von BHV-1 in NRW-
Bestände“*

Juni 2018

Forschungseinrichtung: Fachhochschule Südwestfalen
Fachbereich Agrarwirtschaft
Lübecker Ring 2
59494 Soest
Tel.-Nr.: 0 29 21 / 378 – 3370
Fax-Nr.: 0 29 21 / 378 – 3200
Boelhauve.Marc@fh-swf.de

Projektpartner: Friedrich-Loeffler-Institut
Institut für Virusdiagnostik
Südufer 10
17493 Greifswald - Insel Riems
Tel.-Nr.: 0 38 35 / 17 12 00
Fax-Nr.: 0 38 35 / 17 12 26
Martin.Beer@fli.de

Projektverantwortliche: Prof. Dr. Marc Boelhauve (FH SWF)
Prof. Dr. Martin Beer (FLI)

Autoren:

Odile Hecker (FH SWF)

Anne Thönnissen (FH SWF)

Marc Boelhauve (FH SWF)

Patricia König (FLI)

Martin Beer (FLI)

Gefördert durch:

**Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft,
Natur- und Verbraucherschutz
des Landes Nordrhein-Westfalen**



Inhaltsverzeichnis

1	Literaturübersicht / Zentrale Forschungsaspekte	7
1.1	Übersicht über die Arbeitshypothesen	10
1.2	Untersuchungsschwerpunkte.....	11
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Akquise Projektlandwirte	16
2.2	Blutuntersuchungen	18
2.3	Nasentupferproben	18
2.4	Ganglienpräparation.....	19
2.5	PCR-Analysen:.....	19
2.5.1	Realtime PCR (Ganglienproben).....	19
2.5.2	Realtime PCR (Umwelt-Tupferproben)	20
2.6	Impfungen.....	21
2.7	Milchprobennahme	21
2.8	Reinigung und Desinfektion.....	22
2.9	Untersuchung von Umwelt-Tupferproben auf BHV-1.....	23
2.10	Umgebungstupfer zur Kontrolle der Reinigung und Desinfektion	23
2.11	Schadnager	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Daten der Projektbetriebe.....	26
3.1.1	Besprochene Maßnahmen bei Projektteilnahme	26
3.1.2	Probennahme Betrieb A.....	27
3.1.3	Probennahme Betrieb B	28
3.1.4	Probennahme Betrieb C	33
3.1.5	Probennahme Betrieb D.....	35
3.2	Betriebe E - H.....	38
3.2.1	Probennahme.....	38

3.3	Ergebnisse Blutuntersuchungen.....	45
3.4	Testvergleich der gE-blocking ELISA-Systeme	46
3.5	Ergebnisse Nasentupferproben.....	48
3.6	Ergebnisse der Untersuchung der Ganglien.....	50
3.7	Ergebnisse der Milchproben.....	52
3.8	Ergebnisse der Untersuchung von Umwelt-Tupferproben	53
3.9	Ergebnisse der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen.....	54
3.10	Schadnager	59
4	Diskussion und Zusammenfassung	62
4.1	Allgemeines	62
4.2	Nasentupferproben	62
4.3	Ganglien.....	63
4.4	Umgebungstupferproben zur Kontrolle der R+D	64
4.5	Bewertung der Biosicherheitsmaßnahmen in den Projektbetrieben	66
4.6	Gewichtung Biosicherheit vs. latente Carriertiere	66
4.7	Betrachtung der BHV-1-Impfung und Bestandsräumung	67

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Zustand der Ställe des Betriebs B zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	30
Tabelle 2: Zustand der Ställe zu unterschiedlichen Zeitpunkten ab Leerstand (<i>Auswahl an Bildern</i>)	37
Tabelle 3: Zustand der Ställe zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	43
Tabelle 4: Übersicht Blutuntersuchungen	45
Tabelle 5: Übersicht der Anzahl Tiere mit veränderter Serologie	46
Tabelle 6: Zusammenfassende Ergebnisse des Testvergleichs von gE-blocking ELISA Systemen bei Blutuntersuchungen (N = 968)	47
Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse von Nasentupferproben I.	48
Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse von Nasentupferproben II.	49
Tabelle 9: Zusammenfassung der Eigenschaften der verwendeten Testsysteme im Vergleich Blutserologie/ Fleischsaft Serologie	51
Tabelle 10: Veränderung der Logstufe der Gesamtkeimzahl, Coliformer Keime und Staphylokokken auf unterschiedlichen Materialien nach Reinigung bzw. nach Desinfektion.	59
Tabelle 11: Übersicht über die untersuchten Kleinsäuger (N = 28).....	60
Tabelle 12: Ergebnisse der Untersuchung von Kleinsäufern mittels BHV-1 gB blocking ELISA (Idexx), N= 28.	61

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Ablaufplan für die Ansprache, Teilnahme und Untersuchung von landwirtschaftlichen Betrieben.....	17
Abb. 2: Orte der Tupferprobennahme zur Keimzahlbestimmung in einem der Projektbetriebe.	24
Abb. 3: Tupferproben zum Nachweis von BHV-1 auf Stalloberflächen im Betrieb B.....	29
Abb. 4: Anzahl an koloniebildenden Einheiten von Gesamtkeimzahlen vor der Reinigung (<i>vR</i>), nach der Reinigung (<i>nR</i>) und nach der Desinfektion (<i>nD</i>) auf unterschiedlichen Stalloberflächen. Anmerkung: (<i>x</i>) bezeichnet die jeweilige Probenanzahl (<i>n</i>).	55
Abb. 5: Anzahl an koloniebildenden Einheiten von coliformen Keimen vor der Reinigung (<i>vR</i>), nach der Reinigung (<i>nR</i>) und nach der Desinfektion (<i>nD</i>) auf unterschiedlichen Stalloberflächen. Anmerkung: Die Probenanzahl (<i>n</i>) ist die Anzahl an Proben in jedem einzelnen Reinigungsschritt.	56
Abb. 6: Anzahl an koloniebildenden Einheiten von <i>E. coli</i> vor der Reinigung (<i>vR</i>), nach der Reinigung (<i>nR</i>) und nach der Desinfektion (<i>nD</i>) auf unterschiedlichen Stalloberflächen. Anmerkung: Die Probenanzahl (<i>n</i>) ist die Anzahl an Proben in jedem einzelnen Reinigungsschritt.	57
Abb. 7: Anzahl an koloniebildenden Einheiten von Staphylokokken vor der Reinigung (<i>vR</i>), nach der Reinigung (<i>nR</i>) und nach der Desinfektion (<i>nD</i>) auf unterschiedlichen Stalloberflächen. Anmerkung: die Probenanzahl (<i>n</i>) ist die Anzahl an Proben in jedem einzelnen Reinigungsschritt.	58

1 Literaturübersicht / Zentrale Forschungsaspekte

Die Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit Bovinen Herpes-Viren Typ 1 (BHV-1) bildet seit dem Jahr 1997 als Basisverordnung den rechtlichen Rahmen der BHV-1-Bekämpfung in der Bundesrepublik Deutschland. Die Rechtsvorschrift wurde inzwischen mehrmals überarbeitet, seit Dezember 2001 gilt neben der Anzeigepflicht auch die Untersuchungspflicht für alle weiblichen und männlichen zur Zucht vorgesehenen Rinder. Wichtige Komponenten der neugefassten BHV-1-Verordnung (Neugefasst durch Bek. v. 19.5.2015) sind das Wiederbelegungsverbot von Reagenten zur schnelleren Merzung der verbliebenen Reagenten, die Etablierung von zu untersuchenden Kontaktgruppen nach Erkennung und Entfernung von Reagenten, die Gesamtbestandsimpfung nach Erkennung von Reagenten oder deren Tilgung, und die Erhöhung der Sammelmilchproben auf bis zu 100 Proben im Pool, allerdings nur in anerkannten „Artikel 10 Gebieten“.

Das FLI wertet regelmäßig die bundesweiten Daten zum Vorkommen von BHV-1 in Deutschland und zum Fortschritt der Bekämpfung aus. Die Sanierung von BHV-1 schreitet gut voran, ist jedoch in den verschiedenen Bundesländern unterschiedlich weit fortgeschritten (Gerdes 2005; Homeier, 2015). Der Rechtsrahmen wird kontinuierlich dem jeweiligen Stand des Sanierungsfortschritts angepasst (Anonymous 2016, Bätza 2002). Seit der „Artikel 10“ Anerkennung Bayerns und Thüringens nach der EU-Richtlinie 64/432/EWG durch die EU Kommission im Oktober 2011 und Oktober 2014, wurden kontinuierlich Fortschritte in den übrigen Bundesländern erzielt. Mit Ausnahme von Hamburg, Schleswig-Holstein und dem Landesteil Rheinland von Nordrhein-Westfalen sind zum Zeitpunkt der Antragsstellung alle Bundesländer BHV-1-frei und besitzen den sogenannten Artikel 10 Status.

Im Falle eines Viruseintrags in einen Betrieb in einer BHV-1-freien Region werden zusätzlich zu den Bekämpfungsmaßnahmen auch epidemiologische Ausbruchsuntersuchungen durchgeführt. Die dabei gewonnenen Erfahrungen zeigen, wie vielfältig die Ursachen und Wege der Erregereinschleppung und -verbreitung bei BHV-1 sein können. So sind immer wieder Infektionen mit BHV-1 in BHV-1-freien Betrieben in freien Regionen angezeigt worden (Tierseuchennachrichtensystem, FLI). Erste Analysen dieser Fälle zeigen erhebliche Lücken in den Biosicherheits- und Hygienemaßnahmen der Betriebe. Dabei reichen die Probleme von der Haltung über die Personenkontakte bis hin zur Reinigung und Desinfektion.

Als Reaktion auf die vermehrten Probleme mit Neuausbrüchen in BHV-1-freien Regionen wurde im September 2016 vom BMEL ein Maßnahmen-Papier mit Empfehlungen zur Verstärkung der Schutzmaßnahmen bei BHV-1 an die Länder weitergegeben.

Insgesamt gibt es sehr wenige Studien, die sich mit den Risiken der Einschleppung und der Weiterverbreitung von BHV-1 beschäftigen. So wurde die Transmission zwischen Herden untersucht (Hage et al., 2003) oder die Risikofaktoren der Infektion (Raaperi et al., 2010) beschrieben. Für die Niederlande wurde außerdem die Gefahr einer Einschleppung analysiert (van Schaik et al., 2002). Das Risiko einer Infektion wurde zudem 1993 zusammenfassend publiziert (Wentink et al., 1993). Auch die Weiterverbreitung von BHV-1 wurde modellhaft auf einer Insel untersucht (Hage et al., 2003). Und die Folgen des BHV-1-Statusverlustes wurde wiederum für die Bedingungen in den Niederlanden analysiert (Vonk Noordegraaf et al., 2004).

Diese ganzen Studien sind zum einen schon sehr alt und zudem nicht auf das bundesdeutsche Bekämpfungsmodell zugeschnitten. Für die Bekämpfung in Deutschland gibt es demnach bisher kaum aussagekräftige Studien und Publikationen.

So fehlen insbesondere Studien über die Endphase der BHV-1-Bekämpfung und die damit verbundenen Herausforderungen. Genauere Kenntnisse sind daher von großem Vorteil und ein weitreichender Erkenntnisgewinn in den angesprochenen Feldern ist notwendig.

Dies gilt auch für die latente BHV-1-Infektion, die als zweiter möglicher Eintragsweg in BHV-1-freie Bestände stark diskutiert wird. Zwar wurden bereits früh latente seronegative Carriertiere für BHV-1 beschrieben (Lemaier et al., 2000), dieses Phänomen wurde jedoch nicht weiter untersucht. Auch die Rolle der verschiedenen Ganglien und die Virusgenomlasten und Antigenverteilungen in den Ganglien wurden in den letzten Jahren nicht weiter untersucht. Da die latente Infektion der Reagenten jedoch für die Weiterverbreitung von entscheidender Bedeutung sein kann, sind weitergehende Untersuchungen auf diesem Gebiet unerlässlich.

Deutschland befindet sich zum Antragszeitraum in der Endphase der Sanierung der BHV-1. Ein Großteil der Bundesländer besitzt bereits den Status als BHV-1 freie Region. Seit einigen Monaten vor der Antragstellung wurde allerdings ein gehäuftes Auftreten von BHV-1-Neuinfektionen in freien Regionen beobachtet (Baden-Württemberg, Niedersachsen und Thüringen). Dies führt zur Unsicherheit auf Seiten der BetriebsleiterInnen über den tatsächlichen Status der eigenen Tiere bzw. die Sicherheit der mit negativen Untersuchungsergebnissen zugekauften Tiere.

Ob die Ursache für die Infektionen BHV-1-freier Bestände tier- oder umweltassoziiert ist, ist bis heute nicht eindeutig geklärt und die genauen Einschleppungsmechanismen werden kontrovers diskutiert. Möglich sind Infektionen/ Erregerausscheidungen über vermeintlich als BHV-1-negativ klassifizierte Tiere, bei denen sich die Erreger (noch) in Rückzugsräumen, z.B. Ganglien im Kopf- wie auch Beckenbereich befinden und nur geringe Reaktionen des Immunsystems auslösen, die zudem unterhalb der Detektionsgrenze liegen (sogenannte seronegative latente Carrier-Tiere).

Auch im Rahmen der Sanierung der Betriebe sind eine Reihe von Fragen nicht systematisch untersucht worden und werden deshalb oft einzelfallbezogen entschieden. Darunter Fragen zum Herdenmanagement während der Sanierungsphase, zur Tilgung von Reagenten, zu Untersuchungszeitpunkten und -intervallen, zum Gesamtzeitraum der intensiveren Beprobung, zur Untersuchungsart sowie zum Zeitplan für die Remontierung.

Der Sanierungserfolg hängt von zahlreichen einzelbetrieblichen Biosicherheitsfaktoren ab, deren Auswirkung auf das Einschleppungsrisiko und den Verlauf der Infektion/ Sanierung noch nicht bekannt ist, wie beispielsweise Biosicherheitsstandards (u.a. Desinfektion, Trennung von Reagenten und negativen Tieren), Haltungsbedingungen, Tierdichte, Immunstatus und Durchseuchungsgrad der Herde. Da durch diese Wissenslücken die konsequente Bekämpfung und Prophylaxe der Wiedereinschleppung von BHV-1 erheblich erschwert wird, ist eine wissenschaftliche Untersuchung dieser Fragen dringend geboten.

Die Impfung von Tieren in sog. Artikel 9-Regionen gegen BHV-1 ist ein probates Mittel zur Elimination von BHV-1. Diese Impfung stellt aber weder einen Schutz vor Neuinfektionen noch vor Weiterverbreitung von BH-Viren dar (Bosch et al., 1998; Straub 2001), sondern kann nur die Ausscheidungslast senken (Nandi et al., 2009) und ist daher in Artikel-10-Gebieten untersagt. In den möglichen Projektbetrieben soll daher die bisherige Impfstrategie näher betrachtet und Ableitungen für Ausnahmen des Impfverbotes in Artikel-10-Gebieten abgeleitet werden.

Beispielsweise kann die bei einer Sanierung durchzuführende Reinigung und Desinfektion unzureichend ausgeführt worden sein, sodass Viren in infektiöser Dosis im Bestand verbleiben. Dabei können Erreger in sog. Hotspots (schwer zu reinigende bzw. kaum oder gar nicht zu desinfizierende Bereiche) verbleiben. Hierbei kommen sowohl ungeeignete Materialien für eine Reinigung und Desinfektion in Betracht, wie z.B. verbautes Holz im Tierbereich, poröse Liegematten in Hochboxen oder Instrumentarien, die außerhalb des Tierhaltungsbereichs gelagert werden. Auch die mangelhafte Umsetzung konkreter Hygienemaßnahmen in den Betrieben können ursächlich für eine Infektion sein, wie z.B. Verschleppungen der Erreger durch Personen zwischen Betriebsbereichen (v.a. Abkalbbereich und Jungviehaufzucht) wie auch

mangelnde überbetriebliche Absicherungen durch z.B. Betriebsbesuche oder Teilnahme an Auktionen.

1.1 Übersicht über die Arbeitshypothesen

Dieser Forschungsantrag soll daher

- a) eine genauere Diagnostik der möglichen Rückzugsorte von Herpesviren in nachweislich BHV-1-positiven und –negativen Tieren geben,
- b) das konkrete Ergebnis einer anlassbezogenen Reinigung und Desinfektion durch quantitative mikrobiologische Untersuchungen aufzeigen,
- c) die möglichen Wege der Erregereinschleppungen und -ausbreitungen in rinderhaltenden Betrieben zwischen verbleibenden negativen Tieren, der Umgebung und den neuen Tieren aufzeigen,
- d) mögliche Anpassungen der bisherigen Vorgehensweise für eine zukünftige (Wieder-)Einschleppung von BHV-1 in freie Bestände bzw. Regionen herausarbeiten,
- e) eine exemplarische Überprüfung einer Bekämpfungsmaßnahme (Test-and-remove) ermöglichen,
- f) Ableitung zu Impfstrategien bzw. -konzepten für zukünftige BHV-1-Ausbrüche in Artikel-10-Gebieten abzuleiten,
- g) und die Latenz von BHV-1 in den Ganglien infizierter Rinder näher beleuchten (z.B. Latenzorte, seronegative latente Carriertiere, Genomlast).

Durch die zum Zeitpunkt der Antragstellung sich in der Schlussphase befindliche Eliminierung von BHV-1-positiven Tieren im Rheinland würde sich eine ideale, evtl. letztmögliche und vor allem konkrete Situation für diesen Antrag ergeben, in dem zukunftsorientiert eine weitergehende Diagnostik der Erregerreservoirs mit der praktischen Umsetzung der Dekontamination und gezielten Biosicherheitsmaßnahmen in rinderhaltenden Betrieben kombiniert wird.

Diese Situation ist unter normalen Umständen, d.h. Wiedereinschleppungen von BHV-1 in freie Tierbestände bzw. freie Regionen, nicht möglich, da diese Ereignisse nicht planbar und daher für einen Forschungsantrag nicht darstellbar sind. Des Weiteren wird bei diesen Situationen kaum Zeit und Raum für die Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen bleiben bzw. wird

erschwerend zur spontanen Situation, der Zutritt noch weiterer Personen auf den Betrieb verständlicherweise durch die BetriebsleiterInnen in den seltensten Fällen zugelassen.

In diesem Forschungsprojekt sollen mögliche TierhalterInnen mit den verbliebenen BHV-1-Reagenten über einen Aufruf durch die Landwirtschaftsverbände, die Fachpresse und die Veterinärämter zu einer Teilnahme an dem Projekt animiert werden. Nachfolgend wird im Rahmen einer Betriebsbegehung die bisherige Reagentenanzahl ermittelt und eine erste Hygiene-/Biosicherheitsbetrachtung der Betriebe vorgenommen. Auf Basis einer schriftlichen Verpflichtung sollen sich die TierhalterInnen zur Projektteilnahme erklären. Nach Abgabe der Verpflichtungserklärung wird durch eine konzertierte Aktion der Antragsteller in Abstimmung mit den zuständigen Veterinärämtern und Chemischen- und Veterinäruntersuchungsämtern der aktuelle Stand der Anzahl Reagenten mittels Blut- und ggf. Milchprobenuntersuchungen ermittelt. Die ermittelten Reagenten werden aus den Beständen der Schlachtung zugeführt und dabei mögliche Rückzugsräume (Ganglien) aus den Tierkörpern entnommen und weiter untersucht. Des Weiteren wird angestrebt, die restlichen BHV-1-negativen Tiere im Bestand zusammen zustallen und die freien Ställe bzw. Abteile durch optimierte Reinigungs- und Desinfektionseinheiten zu dekontaminieren. Der Erfolg der Maßnahme wird durch quantitative mikrobiologische Untersuchungen überprüft.

Es wird an dieser Stelle darauf explizit verwiesen, dass es nicht Ziel des Forschungsantrages ist, die letzten BHV-1-Reagenten aus NRW-Beständen zu entfernen. Dieser Antrag basiert auf einer freiwilligen Teilnahme von Landwirten. Zudem sind die verbliebenen Betriebe mit den BHV-1-Reagenten den Antragstellern unbekannt. Somit besteht auch keine Möglichkeit der Kontrolle bzw. der direkten Ansprache in Frage kommender Landwirte durch die Antragsteller mit der Aufforderung der Teilnahme an diesem Projekt. Eine Beschleunigung der Reagentenfreiheit des Rheinlandes wird durch die Projektdurchführung unterstützt.

1.2 Untersuchungsschwerpunkte

- Untersuchungen zur Reinigung und Desinfektion in den Projektbetrieben: In der Rinderhaltung mit unterschiedlichen Stallbaukonzepten und Materialien ist die Frage der Dekontaminierbarkeit von zentraler Bedeutung. Im Projekt sollen deshalb Proben vor, während und nach der Reinigung und Desinfektion genommen werden, um entsprechende Aussagen treffen zu können.

Empfehlungen für die Reinigung und Desinfektion: virologische Untersuchung von Umgebungstupfern vor und nach einer Reinigung und Desinfektion (insbesondere an schwer zu reinigenden, kaum zu desinfizierenden Bereichen).

Beispielsweise kann die bei einer Sanierung durchzuführende Reinigung und Desinfektion unzureichend ausgeführt worden sein, sodass Viren in infektiöser Dosis im Bestand verbleiben. Dabei können Erreger in sog. Hotspots (schwer zu reinigende bzw. kaum oder gar nicht zu desinfizierende Bereiche) verbleiben. Hierbei kommen sowohl ungeeignete Materialien für eine Reinigung und Desinfektion in Betracht, wie z.B. verbautes Holz im Tierbereich oder poröse Liegematten in Hochboxen. Zudem kann es bei unsachgemäßer Durchführung der R&D-Maßnahmen zu Aerosolisierung und Erregerverbreitung auf (noch) BHV-1-negative Tiere kommen. Auch die Umsetzung konkreter Hygienemaßnahmen in den Betrieben können ursächlich für eine Infektion sein, wie z.B. Verschleppungen der Erreger durch Personen zwischen Betriebsbereichen (v.a. Abkalbebereich und Jungviehaufzucht).

- Untersuchung von Schädigern als mögliche Vektoren: Nagetiere sind Reservoir und potentielle Überträger von zahlreichen Krankheitserregern in Viehbeständen. Ob BHV-1 über Nagetiere übertragen werden kann, ist bisher nicht bekannt. Im Projekt sollen daher Nagetiere aus BHV-1 positiven Beständen am FLI auf BHV-1 untersucht werden.

- Latenz/ Carriertiere: Ermittlung möglicher Reinfektionsquellen durch Analyse der Ganglien. Ob die Ursache für die Infektionen BHV-1-freier Bestände tier- oder umweltassoziiert ist, ist bis heute nicht eindeutig geklärt und die genauen Einschleppungsmechanismen werden kontrovers diskutiert. Möglich sind Infektionen/ Erregerausscheidungen über vermeintlich als BHV-1-negativ klassifizierte Tiere, bei denen sich die Erreger (noch) in Rückzugsräumen, z.B. Ganglien befinden und nur geringe Reaktionen des Immunsystems auslösen, die zudem unterhalb der Detektionsgrenze liegen (sogenannte seronegative latente Carrier-Tiere).

Die Präparation der Trigeminalganglien wurde im Vorfeld des Projektantrages in Zusammenarbeit mit der Pathologie des Chemischen- und Veterinäruntersuchungsamtes (CVUA) in Krefeld etabliert.

Beantragter Untersuchungsumfang:

Blutproben: Kombination von Testergebnissen zur Früherkennung von gE-Serokonversionen sowie Ermittlung unvollständig serokonvertierter potentieller Carriertiere

Geplant: ca. 1.000 Proben

Milchproben: Weiterentwicklung der milchserologischen gE-Diagnostik

Geplant: > 50 Einzelmilchproben

Nasentupferproben: frühestmögliche Eliminierung von Ausscheidern

Anzucht von Einzelproben, PCR-Untersuchungen im 5er Pool

Geplant: mind. einen Bestand mit vermeintlich seronegativen Tieren zu beproben, im Optimalfall >200 Nasentupferproben

Umgebungstupfer: Kontrolle von R und D

Anzucht der Einzelproben, PCR der Einzelproben

Geplant: Bei jeder R+D, die im Zuge des Projektes durchgeführt wird (in Kombination mit mikrobiologischer Begleituntersuchung), Anzahl von betrieblichen Gegebenheiten abhängig, mind. 20 Proben pro Betrieb mit R+D

Trigeminalganglien

Geplant: Mindestens 100 Tiere, deren Trigeminaluntersuchungsergebnis mit der Serologie kombiniert ausgewertet werden können

Muskel- Blutpaare

Geplant: Möglichkeit der Untersuchungen von Tausaft (Schlachthofbeprobung) parallel zur Serologie

Literatur:

Ackermann, M und M. Engels (2006): Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol.*, 31;113(3-4):293-302.

Anonymous (2016): BHV-1-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Mai 2015, durch Artikel 1 der Verordnung vom 3. Mai 2016 geändert.

Bätza, H.J. (2002): Die Regelungen der geänderten BHV-1-Verordnung. *BPT-Info*. 4.02, *Nutztierpraxis*, 9-12.

Beer, M. (2005): Aktuelle Grundsätze der Bekämpfung und Diagnostik der BHV-1-Infektion. Symposium zur BHV-1-/BVD-Bekämpfung, Tagungsbroschüre.

Bosch, J.C., De Jong, M.C.M., Franken, P., Frankenas, K., Hage, J.J, Kalashoek, M.J., Maris-Veldhuis, M.A., Noordhuizen, J.P.T.M., Van der Poell, W.H.M., Verhoeff, J., Weerdmeester, K., Zimmer, G.M. and Van Oirschotj, J.T. (1998): An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine*, 16 (2/3), 265-271.

Gerdes U. (2005): Experiences with the eradication of the bovine herpes virus 1 in Lower Saxony. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 112(8), 307-308.

Homeier T., Neumann N., König P., Beer M. (2015):
<https://www.fli.de/de/publikationen/tiergesundheitsjahresberichte/>

Hage JJ, Schukken YH, Schols H, Maris-Veldhuis MA, Rijsewijk FA, Klaassen CH. 2003. Transmission of bovine herpesvirus 1 within and between herds on an island with a BHV1 control programme. *Epidemiol Infect.* 2003;130(3):541-52.

Lemaire M, Meyer G, Baranowski E, Schynts F, Wellemans G, Kerkhofs P, Thiry. 2000. Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *J Clin Microbiol.* 38(11):4233-8.

Meyer G, Lemaire M, Ros C, Belak K, Gabriel A, Cassart D, et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.* 2001; 146:633–652.

Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS (2008): Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev.* 2009 Jun;10(1):85-98.

Raaperi K, Nurmoja I, Orro T, Viltrop A. 2010. Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. *Prev Vet Med.* 2010;96(1-2):74-81.

Straub, O. C. 1990. Infectious bovine rhinotracheitis, p. 71–108. In Z. Dinter and B. Morein (ed.), *Virus infections of ruminants.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

Straub, O.C. (2001): Advances in BHV1 (IBR) Research. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 108, 419-422.

van Schaik G, Schukken YH, Nielen M, Dijkhuizen AA, Barkema HW, Benedictus G 2002. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Prev Vet Med.* ;54(3):279-89.

Vonk Noordegraaf A, Labrovic A, Frankena K, Pfeiffer DU, Nielen M 2004. Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. *Prev Vet Med.* 2004;62(1):51-8.

Wentink GH, van Oirschot JT, Verhoeff 1993. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV1): a review. *J. Vet Q.* 1993;15(1):30-3. Review.

Winkler MT, Doster A, Jones C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J. Virology.* 2000; 74:5337–5346. PMID: 10799611.

2 Material und Methoden

2.1 Akquise Projektlandwirte

Bis zum 26.09.2016 ist der BHV-1-freie Status für das Rheinland noch nicht beantragt worden. Dies bedeutet, dass noch BHV-1-positive Betriebe und somit Tiere existieren müssen. Die Anzahl, Lage, Struktur und Größe der Betriebe sind den Antragstellern nicht bekannt. Daher wurden BHV-1-positive Betriebe von den jeweiligen Veterinärämtern mit der Bitte um Forschungsteilnahme und Datenfreigabe angesprochen. Ein weiterer Betrieb wurde vom Rheinischen Landwirtschaftsverband ebenfalls mit der Bitte um Forschungsteilnahme und Datenfreigabe angesprochen. Nach Erteilung der Datenfreigabe kam es zu einer Ansprache der potentiellen Projektlandwirte seitens der FH SWF und zu einem Besuch mit den Akteuren der FH SWF und dem örtlichen Veterinäramt auf den jeweiligen Betrieben. Bei diesem Besuch wurde der Ablaufplan des Projektes skizziert (Abb. 1) und ein vorläufiger erster betriebsspezifischer Maßnahmenplan mit den Landwirten besprochen. Es bestand zu diesem Zeitpunkt für die Landwirte zudem die Möglichkeit bei Entscheidung für eine Projektteilnahme eine Verpflichtungserklärung und eine HI-Tier-Vollmacht zu unterzeichnen.

Ablaufplan für die Ansprache, Teilnahme und Untersuchung von landwirtschaftlichen Betrieben

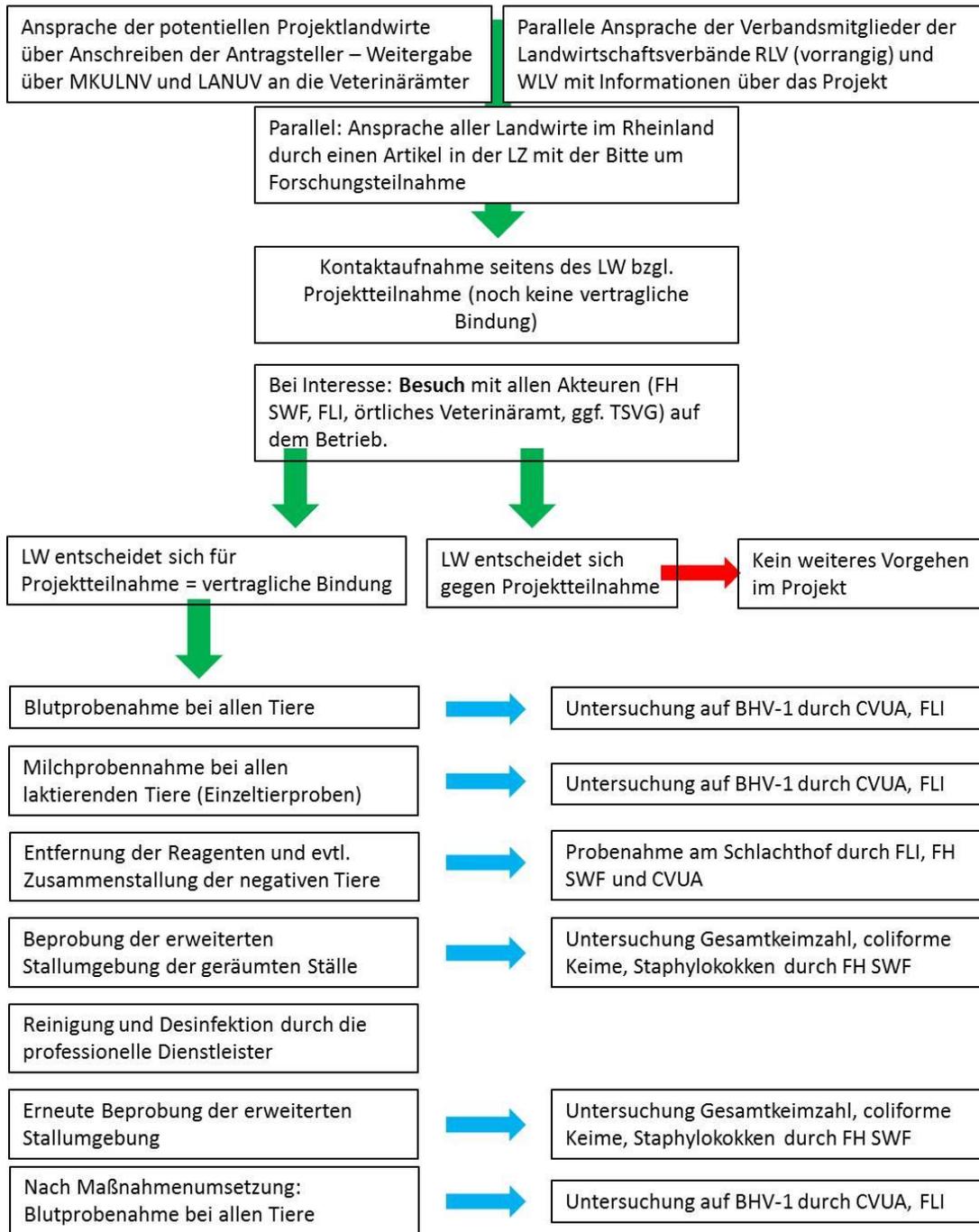


Abb. 1: Ablaufplan für die Ansprache, Teilnahme und Untersuchung von landwirtschaftlichen Betrieben.

2.2 Blutuntersuchungen

Die Tiere wurden in den Fressfanggittern, Liegeboxen, oder Treibgängen fixiert. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Vena caudalis mediana mit einer 18 G X 1 1/2“ Einmalkanüle. Das Blut wurde in 7,5 ml Röhrchen (EDTA, Kabevette®L) von Kabe Labortechnik aufgefangen und bei Raumtemperatur aufrechtstehend an das CVUA-RRW in Krefeld verschickt bzw. persönlich durch Mitarbeiter der FH SWF abgeliefert.

Die Daten in den CVUA-Ergebnisberichten sind nicht in allen Fällen identisch mit den tatsächlichen Untersuchungsdaten. Zum einen erstreckten sich die Blutuntersuchungen durch die große Tieranzahl auf zwei bzw. drei Tage und zudem mussten einzelne Tiere nachbeprobte werden, da sie an den Hauptuntersuchungsterminen nicht zur Blutentnahme abgesondert werden konnten und eine Einzeltiersuche ohne Absonderung nicht sinnvoll und praktikabel gewesen wäre.

Um eine umfangreiche Vergleichsanalyse der drei in Deutschland zugelassenen Testsysteme für den Nachweis von Antikörpern gegen das Glykoprotein E des BHV-1 durchzuführen, wurden insgesamt 968 Blutproben mit unterschiedlichem Status zeitgleich am FLI und CVUA-RRW untersucht. Die Testdurchführung erfolgte nach den Herstellervorschriften, die Farbentwicklung wurde im Tecan infinite F200 pro bestimmt.

2.3 Nasentupferproben

Nach Fixierung der Tiere in den Fressfanggittern erfolgte die Beprobung mittels Nasentupfer Sigma-Virocult (Polyurethanspitze 2,0 ml Virocult Flüssigmedium) der Firma Sigma, München, Deutschland. Hierzu wurden die Nasentupfer in den rechten respektive linken Nasengang eingeführt und einige Sekunden lang, an der Nasenschleimhaut hin und her bewegt und anschließend entfernt. Die Tupferproben wurden einmalig bei Raumtemperatur, bei allen folgenden Tupferprobennahmen durch Kühlakkus gekühlt, per Expressversand an das FLI nach Greifswald-Riems versendet.

Die Untersuchung erfolgte analog zur Untersuchung der Umgebungstupfer. In der Zellkultur wurden die Proben stets als Einzelproben untersucht. Für den Genomnachweis wurden meist Pools aus jeweils fünf Nasentupferproben analysiert. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurden die Proben manuell extrahiert und einer Wiederholung der PCR-Untersuchung im Einzelansatz angeschlossen.

Nasentupferproben: IF-Analyse der Isolate

Die Untersuchung der Isolate mittels Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte nach Labor-Standard-Methoden.

2.4 Ganglienpräparation

An den einzelnen Schlachthöfen wurden die Schädel der geschlachteten Tiere mit den jeweiligen Ohrmarkennummern gekennzeichnet und per Kurier entweder an die Pathologie des CVUA-RRW in Krefeld oder an das FLI in Greifswald-Riems verbracht bzw. durch Mitarbeiter der FH SWF direkt an die beiden Standorte verbracht.

Untersuchungsgang

Beide Trigeminalganglien wurden aus den eröffneten Rinderschädeln präpariert und asserviert. Da nicht von einer unterschiedlichen Verteilung von latentem BHV-1 ausgegangen wird, wurde ein Teilstück für die Nukleinsäureextraktion präpariert. Sämtliche Proben wurden manuell bearbeitet. Es wurde das Gewebe-Protokoll des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) angewandt. Die Aufnahme der Gesamt-DNS erfolgt in 60 µl Elutions-Puffer.

Da bei der Anwendung der artifiziellen Insemination in den Milchviehbeständen dem genitalen Infektionsweg keine nennenswerte Rolle zukommt, konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Präparation und Analyse der Trigeminalganglien. Eine Präparation der Sakralganglien war aufgrund der zeitlichen Abläufe der Schlachtprozesse nicht möglich bzw. erwiesen sich die räumlichen Separationsmöglichkeiten in den Schlachthöfen als ungeeignet für die zeitlich aufwendigere Ganglienpräparation.

2.5 PCR-Analysen:

2.5.1 Realtime PCR (Ganglienproben)

Die Analyse der Gewebeproben erfolgte in 25 µl Reaktionsansätzen unter Einsatz von jeweils 5 µl Probenvolumen. Da die zu erwartende Last an Virusgenom in der Latenzphase im Bereich weniger Viruskopien liegen kann, wurden die Proben in Triplikaten untersucht, um eine Maximierung der Sensitivität zu erzielen. In der Triplex-BHV-1 PCR nach Wernike wurden die Ansätze simultan auf das Vorliegen von BHV-1 Glykoprotein D (Impfvirus und Feldvirus) und Glykoprotein E (nur im Feldvirus vorhanden) untersucht. Zur Kontrolle der Extraktion und zum Ausschluss des Vorliegens

von PCR-Inhibitoren in den Proben wurden zelluläre b-Aktin-Sequenzen co-amplifiziert. Bei sämtlichen untersuchten Proben wurden Aktin ct-Werte generiert, die eine zuverlässige Analyse der Ganglien gewährleisten konnten. Als PCR-Plattform wurden das CFX96 Real-Time System von Bio-Rad (C1000 Touch Thermal Cycler) sowie das Mx3005P System von Stratagene eingesetzt.

Die Wiederfindungsrate von latentem BHV-1 bei ungeimpften Tieren wird mit $\geq 80\%$ angegeben. In eigenen Untersuchungen wurde eine Korrelation von 92 bis 95 % zwischen Antikörper- und Genomnachweis erzielt. Die Nachweisraten von BHV-1 Feldvirus in geimpften Tieren sollte deutlich geringer sein, da bei bestehendem Impfschutz der Rückzug des Virus in die neuronale Latenz zwar nicht umfassend verhindert aber zumindest reduziert wird. Die geschätzten Raten von geimpften BHV-1 Trägern nach Feldinfektion bewegen sich zwischen 50 und 70 %. Belastbare Studien liegen jedoch nicht vor.

Proben wurden positiv bewertet, wenn sie positiv für gD und gE reagierten. Aufgrund der höheren Sensitivität der gE-PCR wurden auch zwei positive gE-Reaktionen bei negativer gD-PCR als echt positiv eingestuft. Einzelne positive Ergebnisse wurden als falsch negativ eingeordnet.

2.5.2 Realtime PCR (Umwelt-Tupferproben)

Genomnachweis mittel PCR (Polymerase-Kettenreaktion):

Die Nukleinsäureextraktion erfolgte automatisiert im 96-Loch-Format im Kingfisher Biosprint (Kingfisher Flex; Thermo Scientific) mit dem MagAttract Mini M48 (Qiagen). 200 μl Tupferflüssigkeit wurden eingesetzt, die Elution erfolgte in einem Volumen von 100 μl . Da in den Umweltproben generell geringe residuale Viruslasten zu erwarten sind, wurden sämtliche Proben im Einzelansatz getestet.

Die Präparationen der Nukleinsäuren für Nachuntersuchungen wurden manuell durchgeführt. Es wurde das Protokoll des High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche) für zellarme Matrices angewandt. Die Elution erfolgt in 60 μl Puffer.

Realtime PCR:

Die Analyse der Tupferproben erfolgte in 25 μl Reaktionsansätzen unter Einsatz von jeweils 5 μl Probenvolumen. In der Triplex-BHV-1 PCR nach Wernike wurden die Ansätze simultan auf das Vorliegen von BHV-1 Glykoprotein D (Impfvirus und Feldvirus) und Glykoprotein E (nur im Feldvirus vorhanden) untersucht. Zur Kontrolle der Extraktion und zum Ausschluss des Vorliegens von PCR-Inhibitoren in den Proben wurden zelluläre β -Aktin-Sequenzen co-amplifiziert. Im Falle eines negativen Aktin-Nachweises wurde zunächst die PCR-Untersuchung wiederholt.

Gegebenenfalls wurden die Proben neu extrahiert. Als PCR-Plattform wurden das CFX96 Real-Time System von Bio-Rad (C1000 Touch Thermal Cycler) sowie das Mx3005P System von Stratagene eingesetzt.

2.6 Impfungen

Nach Fixierung der Tiere in den Fressfanggittern erfolgte eine intranasale Impfung mit dem Impfstoff Rispoval, bzw. die intramuskuläre Impfung von 2 ml Hiprabovis®IBR Marker Live Impfstoff (Hipra UK, Ltd., Nottingham, UK) nach den jeweiligen Herstellervorschriften zur Anwendung. Die Impfungen wurden im Auftrag der FH SWF durch den Hoftierarzt durchgeführt, da die Tiere parallel geimpft und Blutproben genommen wurden. Diese gleichzeitige Tätigkeit war durch die Mitarbeiter der FH SWF nicht zu leisten.

Die oben beschriebenen Impfungen wurden nur in einem Betrieb im Rahmen des Projektes für die Untersuchung der Praktikabilität des test-and-remove-Ansatzes durchgeführt (Schutz bisher BHV-negativer Tiere vor Ansteckung durch Separation von den Reagenten und gleichzeitigem Impfschutz). Zwei weitere Betriebe führten die bisherigen Impfprogramme in Abstimmung mit den jeweiligen Veterinärämtern während der Projektlaufzeit weiter durch (ohne test-and-remove-Verfahren).

2.7 Milchprobennahme

Zur Milchprobennahme (durch FH SWF) wurden die Euter der Tiere während des Melkprozesses gereinigt und die Milch in gereinigten Milchkannen gemolken. Anschließend wurden 750 ml Milch der Kühe in je eine Weithalsflasche aus PE (rund, 750 ml, 175 x 88 mm; Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland) umgefüllt, zur Konservierung mit Natriumazid-Tabletten (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland) versehen und mit einem Schraubverschluss (GL50, Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland) verschlossen. Übernacht wurden die Proben bei 6-8°C gekühlt gelagert und am darauffolgenden Tag, durch Kühlakkus gekühlt, per Expressversand an das FLI Greifswald-Riems versendet.

Es wurden zwei gE-blocking ELISAs nach den speziell für Milch entwickelten Protokollen der Hersteller sowie ein indirekter gE Milch-ELISA mit und ohne Aufkonzentrierung der Proben durch Ammoniumsulfatfällung verglichen. Die Milch wurde aufgetaut, entrahmt und nach den jeweiligen Gebrauchsinformationen getestet.

2.8 Reinigung und Desinfektion

Die Reinigung und Desinfektion (R+D) wurde durch die Mitarbeiter der FH SWF durchgeführt. Zwei Betriebe konnten nicht gereinigt werden, da nur BHV-1-positive Einzeltiere aus dem Bestand entfernt wurden und dadurch keine Möglichkeit zur R+D bestanden hat. Ein Betrieb war aufgrund der äußerst schlechten baulichen Struktur nicht zu reinigen bzw. zu desinfizieren.

Im Leerstand wurde vor dem Einweichen grober Schmutz und Mist mechanisch aus den Ställen entfernt. Danach erfolgte in den Ställen der Abbau demontierbarer Ausrüstungsteile wie z.B. Fütterungseinrichtungen. Diese wurden gesonderten R+D-Maßnahmen außerhalb des Stalles zugeführt. Der anfallende Schmutz wurde zusammengefasst, aus dem Stall entfernt und mit Desinfektionsmittel (Venno Vet 1 Super, Fa. Menno Chemie Vertriebsgesellschaft mbH, Norderstedt, Deutschland) überschüttet.

Die anschließende Nassreinigung der Stallungen bestand aus den folgenden Schritten: Einweichen, Vorreinigung mittels Hochdruckreiniger, Ausbringung von alkalischem Reinigungsmittel, intensiver Hochdruckreinigung und Trocknung der Flächen. Nach dem Einweichen der Oberflächen mit Wasser folgte die eigentliche Hochdruckreinigung mit 25 l Wasser/min mittels Flachstrahldüsen und einem Druck von 75 – 120 bar je nach Verschmutzung mit Hochdruckreinigern der Firma Kärcher, Typ HBS 500c, Winnenden, Deutschland und der Firma Stadiko, Typ HDVAR 7,5125-150, Dinklage, Deutschland. Die Reinigung wurde bis zur visuellen Sauberkeit des Objektes durchgeführt, so dass die Oberflächenstruktur, die Farbe sowie die ursprüngliche Beschaffenheit des Materials überall deutlich erkennbar waren und das abfließende Spülwasser frei von Schmutzpartikeln blieb. Nach der Reinigung der Ställe mit Wasser erfolgte eine Behandlung des Stalls mit dem Schaumreiniger Menno® Clean (Fa. Menno Chemie Vertriebsgesellschaft mbH, Norderstedt, Deutschland). Aufgetragen wurde dieser mit einem Hochdruckreinigungsgerät der Fa. Stadiko mit entsprechenden Schaumlanzen derselben Firma und einer Dosierung von zwei Prozent. Nach einer Einwirkzeit des alkalischen Schaumreinigers von mindestens 5 Minuten wurden die Flächen erneut mit Hochdruckreinigern gründlich gereinigt. Nach Abschluss dieser Arbeiten wurden bestehende Wasserreste entfernt. Anschließend ruhten die Ställe bis zur Abtrocknung. Nach dem Abtrocknen der Stalloberflächen erfolgte die Desinfektion mit dem Gerät Skumix® Typ 10 (Firma Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt, Deutschland) und einer Schaumlanze. Als Desinfektionsmittel wurde Venno® Vet 1 Super (Firma Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt, Deutschland) in einer 1 %igen Lösung verwendet. Die Ausbringung erfolgte im Niederdruckbereich von drei bis sechs Bar.

2.9 Untersuchung von Umwelt-Tupferproben auf BHV-1

Es wurden sowohl vor dem Start der R+D wie auch nach Abschluss der Maßnahmen Tupferproben für den Virusnachweis genommen. Die zu untersuchenden Flächen bzw. Gegenstände wurden mit Tupfern (Sigma-Virocult mit 2 ml Transportmedium, Produkt 30MW950S, CheckDiagnostics, Deutschland) anhand zuvor definierter Punkte mittels Probenplan (siehe S. 29 **Abb. 3**) gewonnen und zur weiteren Bearbeitung gekühlt an das FLI nach Greifswald-Riems versendet.

Virusisolierung in Zellkultur:

Für den Virusnachweis in Zellkultur wurden sämtliche Proben als Einzelproben in mindestens zwei Replikaten analysiert. Madin Darby Bovine Kidney Zellkulturen (MDBK 261; Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV)) wurden 24 h vor dem Beimpfen angelegt. Zwei Replikate auf Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 100 µl der Tupferflüssigkeit bei 37°C inkubiert. Abnehmen des Inokulums und Mediumwechsel erfolgte nach einer Stunde. Die Kulturen wurden täglich lichtmikroskopisch untersucht. Beim Auftreten eines BHV-1 typischen cytopathogenen Effekts wurden die Überstände auf frische Kulturen überführt. Das Vorliegen von BHV-1 wurde durch virusspezifische Immunfluoreszenzfärbungen bzw. BHV-1 PCR überprüft und verifiziert (siehe 2.5.2 Realtime PCR (Umwelttupfer-Proben)).

2.10 Umgebungstupfer zur Kontrolle der Reinigung und Desinfektion

Die Beprobung der unterschiedlichen Materialien der Projektstätte erfolgte anhand zuvor definierter Punkte mittels Probenplan (**Abb. 2**). Alle Beprobungspunkte wurden dreimalig untersucht. Die erste Beprobung erfolgte nach Ausstallung der Tiere im ungereinigten Stall. Die zweite Beprobung wurde nach der Reinigung mit dem Hochdruckreiniger und die dritte nach der Desinfektion durchgeführt. Hierzu wurden sterile Tupfer [Critical Swab, 4,5" (114,0 mm), VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland] mit Peptonwasser (Merck chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland) angefeuchtet und mittels einer 5 x 4 cm Schablone (Copan Italia S.P.A., Brescia, Italy) eine Fläche von 20 cm² beprobt. Die Beprobung von Tränken erfolgte mithilfe eines Lineals und Tupfer [Critical Swab, 5,2" (131,0 mm), VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]. Hierbei wurde eine Probenfläche von 21 cm² beprobt. Die Proben wurden mit Kühlakkus gekühlt zum Labor der FH SWF transportiert und unverzüglich mikrobiologisch untersucht.

Die Keime an den Tuffern wurden durch Vortexen in die Lösung überführt. Um auszählbare Ergebnisse auf den Nährbodenplatten zu gewährleisten, wurden die Proben vor Ausplattierung mittels Verdünnungsreihen mit Peptonwasser (Merck chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland) weiter verdünnt: Plate-Count-Agar-Platten (Oxoid, Thermo Fisher Diagnostics GmbH Microbiology, Wesel, Deutschland) zur Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl, REBECCA-Platten (bioMérieux SA, Marcy l’Etoile, Frankreich) zum Nachweis coliformer Keime und Mannitol-Salt-2-Agar-Platten (bioMérieux SA, Marcy l’Etoile, Frankreich) zum Nachweis von Staphylokokken. Die Nährbodenplatten wurden für 24 Stunden (REBECCA und Mannitol-Salt-2-Agar) bzw. 48 Stunden (Plate-Count-Agar) bei 37°C inkubiert.

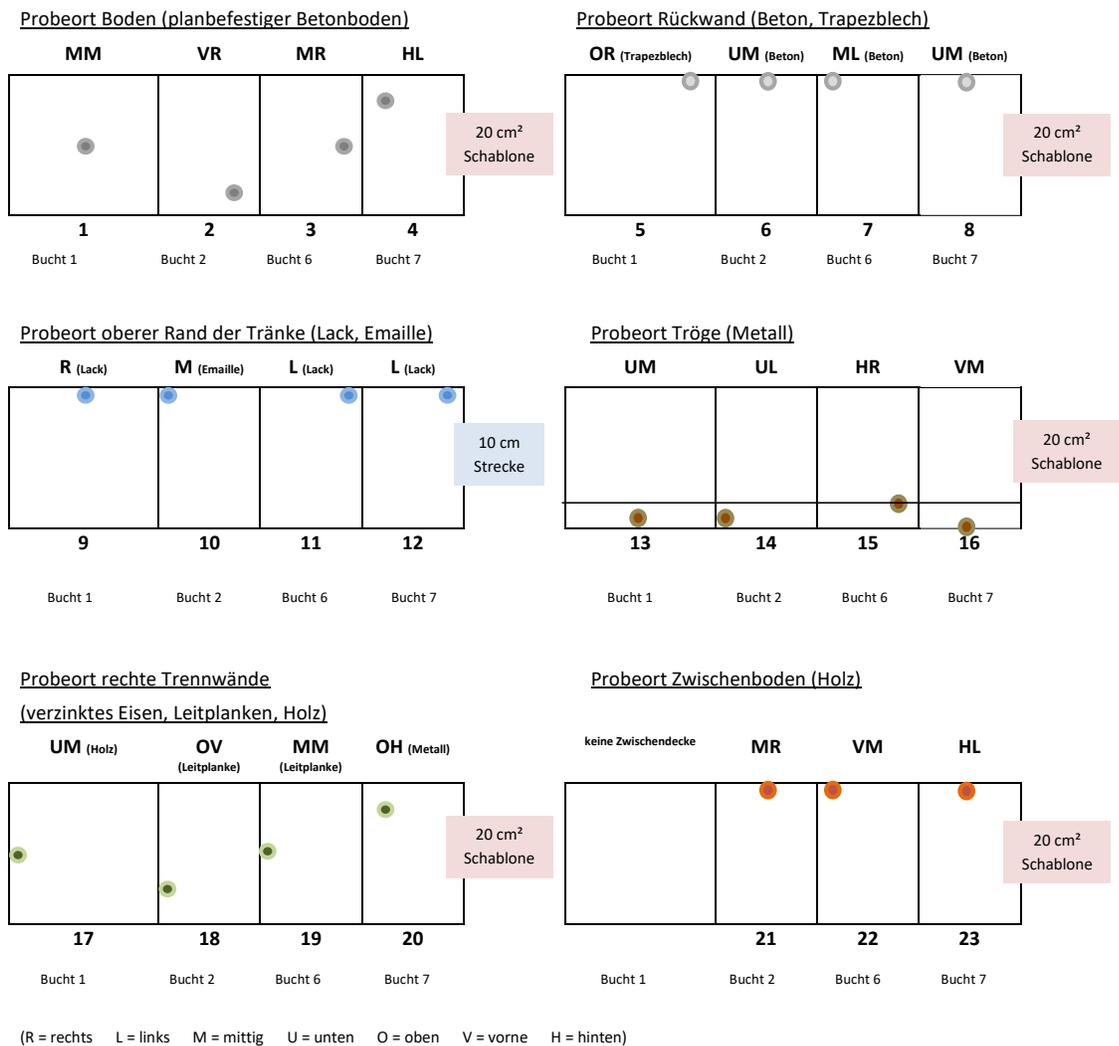


Abb. 2: Orte der Tuffertprobennahme zur Keimzahlbestimmung in einem der Projektbetriebe.

2.11 Schadnager

Die begleitende Schadnagerbekämpfung wurde in drei Betrieben im Zeitraum November 2016 bis Februar 2017 von einem professionellen Schadnagerbekämpfer mit entsprechendem Sachkundenachweis durchgeführt. Während der Bekämpfungsmaßnahmen mit Antikoagulanzen wurden verendete Schadnager gesammelt und bei -70°C eingefroren. Diese wurden zur Untersuchung auf BHV-1 auf Trockeneis per Expresspost am 23.02.2017 an das FLI Greifswald-Riems versandt.

Bei der Sektion der Tiere wurden die Brusthöhle nach Entnahme von Herz und Lunge mit Phosphatpuffer gespült. Die stark bluthaltigen Lavageflüssigkeiten wurden im speziesunabhängigen BHV-1 blocking ELISA des Herstellers Idexx untersucht. Dabei wurde das Protokoll für die Untersuchung von Rinderblutproben eingesetzt. Zur Maximierung der Sensitivität erfolgte die Proben-Inkubation im Über-Nacht-Protokoll.

3 Ergebnisse

3.1 Daten der Projektbetriebe

Aus datenschutzrechtlichen Gründen werden in diesem öffentlich zugänglichen Bericht keine betriebsspezifischen Daten aufgeführt, die zu einer nachträglichen Identifikation der Betriebe führen könnten. Dies schließt Stall- und Lagepläne ein, soweit aus diesen eine Betriebsidentifikation möglich erscheint.

Im Nachfolgenden werden die Aktivitäten bzw. Maßnahmen zusammenfassend bzw. Tierzahlen, sofern auf Einzelbetriebsebene interessant, nur prozentual darstellt.

In der Summe nahmen acht Betriebsstätten an diesem Projekt teil.

3.1.1 Besprochene Maßnahmen bei Projektteilnahme

3.1.1.1 Betriebe mit einem Anteil unter 10% BHV-1-positive Tiere (Betriebe A und B)

Es gab bei den Projektbetrieben zwei unterschiedliche Maßnahmenpakete, die sich auf Basis des BHV-1-Status in den jeweiligen Betrieben ergaben. Zwei der Betriebe hatten unter 10% positive Reagenten. Hier erstreckten sich die besprochenen Maßnahmen auf:

- Blutuntersuchung aller Tiere
- Start der Untersuchungen: Ende Oktober/1. Novemberwoche 2016
- Schlachtung der bisherigen und neuen Reagenten mit Probenahme
- Keine Reinigung und Desinfektion des Stalles
- Hochtragende Tiere sind nicht transportfähig bzw. besteht Transportverbot. Tiere müssen zuerst Abkalben, bevor diese aus den Beständen entfernt werden können

Für die einzelnen Schlachttermine wurde eine frühzeitige, d.h. mindestens 24 Stunden vorherige Informationsweitergabe per E-Mail über die Termine der anstehenden Tiertransporte, den Namen des Transportunternehmens und des Schlachthofes in NRW vereinbart, damit Mitarbeiterinnen der FH SWF an den Schlachttieren Proben nehmen können. Dem haben alle Betriebsleiter gefolgt.

Nach Ende der Maßnahmen und Untersuchung der verbliebenen Tiere auf BHV-1-Negativität konnten die Betriebe durch die zuständigen Veterinärämter frei gegeben werden.

3.1.1.2 Betriebe mit einem Anteil über 10% BHV-1-positive Tiere

Sechs der Betriebsstätten hatten deutlich über 10% positive Reagenten im Bestand.

3.1.2 Probennahme Betrieb A

Blutproben

Die Proben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld mittels BHV1-gE Ak-ELISA auf BHV-1 untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung zeigte 92,2% negative, 6,9% positive und zu 0,9% fragliche Proben.

Schlachtungen

Es wurden alle positiven bzw. fraglichen Tiere geschlachtet und Blutproben und Schädel gewonnen. Die Blutproben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte nur eine negative bei ansonsten nur positiven Proben. Die Schädel der Tiere wurden zur Präparation der Trigeminalganglien an das CVUA-RRW Krefeld verbracht.

Schadnagerbekämpfung

Die Schadnagerbekämpfung wurde im Zeitraum November 2016 bis Januar 2017 durch einen professionellen Schadnagerbekämpfer durchgeführt. Während der Bekämpfungsmaßnahmen wurden 34 verendete Mäuse auf dem Betrieb gefunden und an das FLI Greifswald-Riems übersandt.

Abschlussuntersuchung

Eine abschließende Blutprobenentnahme erfolgte 30 Tage nach Entfernung des letzten Reagenten bei allen Tieren. Die Proben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht (Tagebuchnummer: HI 304). Das Ergebnis der Untersuchung mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte nur negative Proben.

3.1.3 Probenahme Betrieb B

Nach Aussage des Landwirts hat es im Mai 2016 einen BHV-1 Einbruch gegeben. Hierbei sind zwei Tiere verendet, wovon ein Tier zur Sektion an das CVUA-RRW Krefeld geliefert wurde. Dort wurde das Tier als BHV-1-positiv diagnostiziert. Die zuletzt untersuchten Tiere zeigten bei Beprobungen am Schlachthof eine Durchseuchungsrate von über 90%. Die durch das Veterinäramt festgelegten Maßnahmen beinhalten eine Impfung der neu einzustallenden Tiere zwei Wochen vor Einstellung, inklusive einer Wiederholungsimpfung (i.m.). Die Impftiere hält der Landwirt zurzeit separiert auf einer Stallseite, die vor Belegung gereinigt und desinfiziert wurde.

Vor dem Termin zur Blutentnahme der Impftiere wurde die andere Seite des Stalls geräumt. Die Buchten wurden grob vom Kot gereinigt (Vermeidung von Aerosolen) und alle tierfreien Bereiche zuerst mit Niederdruck desinfiziert. Danach erfolgte die eigentliche Reinigung und Desinfektion.

Der restliche Tierbestand wird komplett geräumt, da hieraus die hohe prozentuale Anzahl an Reagenten detektiert wurde. Nach Abschluss der Stallräumung werden in den Tierställen durch die MitarbeiterInnen der FH SWF Umgebungsproben genommen. Bei der Vorbereitung der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen ist eine aktive Mithilfe seitens des Betriebes vereinbart worden. Mögliche Hilfe würde bei z.B. bei der Entfernung des groben Dreckes und der Entfernung der Einstreu benötigt. Anschließend erfolgte die Reinigung und Desinfektion des tierfreien Stalles durch die MitarbeiterInnen der FH SWF.

Für die einzelnen Schlachttermine wurde eine frühzeitige, d.h. mindestens 24 Stunden vorherige Informationsweitergabe per E-Mail über die Termine der anstehenden Tiertransporte, den Namen des Transportunternehmens und des Schlachthofes in NRW vereinbart, damit die MitarbeiterInnen der FH SWF an den Schlachttieren Proben nehmen kann.

Geplant ist ferner, eine abschließende Blutuntersuchung der geimpften Tiere 30 Tage nach Abschluss der Räumung und Reinigung und Desinfektion vorzunehmen.

Nach Ende der Maßnahmen und Nachweis der BHV-1-Negativität erfolgte die Freigabe des Betriebes durch das Veterinäramt des Kreises Euskirchen mit der Auflage, dass keine Tiere in den Stall mit den Impftieren eingestallt werden und die Tiere bei Erlangung der Schlachtreife der Schlachtung zugeführt werden und anderweitig nicht den Betrieb verlassen dürfen. Auf Biosicherheitsmaßnahmen vor Stallzutritt wurde mündlich und schriftlich verwiesen. Zum Zeitpunkt der Berichterstellung (Juni 2018) ist dieser Betrieb BHV-1-negativ geblieben und hat sich an die besprochenen Maßnahmen gehalten.

Untersuchung von Umwelt-Tupferproben auf BHV-1

Die Probennahme von Umwelt-Tupferproben zur Untersuchung auf BHV-1 erfolgte vor und nach Reinigung und nach Desinfektion. Die gewählten Oberflächen sind exemplarisch aus **Abb. 3** zu entnehmen.

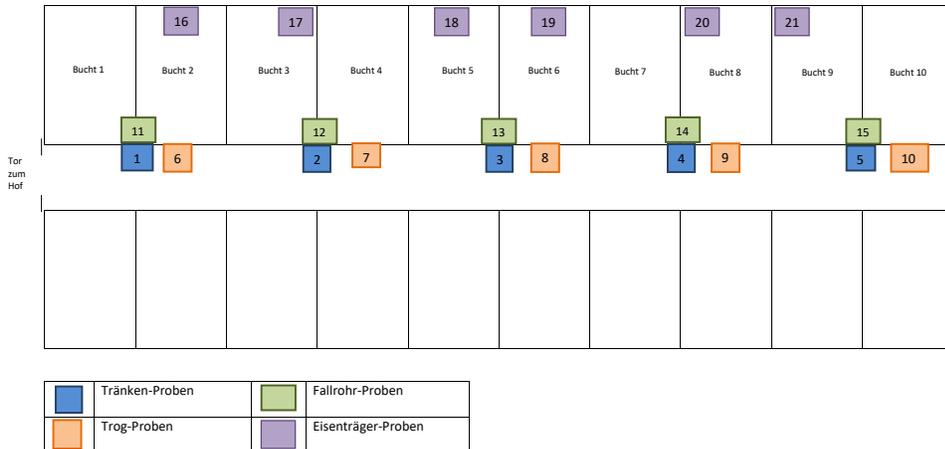


Abb. 3: Tupferproben zum Nachweis von BHV1 auf Stallobereflächen im Betrieb B.

Umgebungstupferproben zur Kontrolle der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen

Zur Kontrolle der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen wurden zu den unterschiedlichen Reinigungs- bzw. Desinfektionsabschnitten (vor Reinigung, nach Reinigung und nach Desinfektion) Umwelttupferproben gewonnen und auf deren Keimgehalte untersucht. Die gewählten Oberflächen und die zusammengefassten Ergebnisse sind unter Punkt 3.9 Ergebnisse der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zusammengefasst.

Tabelle 1: Zustand der Ställe des Betriebs B zu unterschiedlichen Zeitpunkten

a. Stall 1

Vor Reinigung		
Nach Reinigung		

Nach Reinigung
Beispiel schwer zu reinigender Stellen





Tupferproben zum Nachweis von BHV-1

Nach Ausstellung vermeintlicher Reagenten wurden 21 Tupferproben zum Nachweis von BHV-1 auf Stalloberflächen gewonnen. Die Proben teilten sich auf in fünf Tupferproben aus Tränken, fünf Proben aus den Trögen, fünf Proben an Fallrohren des Stalls, sowie sechs Eisenträger-Proben. Die Tupferproben wurden gekühlt postalisch zur Analyse an das FLI Greifswald-Riems verschickt. Die Ergebnisse sind unter 3.8 Ergebnisse der Umgebungstupfer-Proben auf S. 53 zusammengefasst.

Schlachtungen

Es wurden alle nicht-geimpften Tiere geschlachtet und Blutproben und Schädel gewonnen. Die Blutproben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte eine Durchseuchung der Tierpopulation von über 90%. Die Schädel der Tiere wurden zur Präparation der Trigeminalganglien an das CVUA-RRW Krefeld verbracht.

Schadnagerbekämpfung

Die Schadnagerbekämpfung wurde parallel zu den Untersuchungen bzw. Reinigungs- und Desinfektionsarbeiten durch einen professionellen Schadnagerbekämpfer durchgeführt. Während der Bekämpfungsmaßnahmen wurden 13 verendete Mäuse und eine verendete Ratte auf dem Betrieb gefunden und an das FLI Greifswald-Riems übersandt.

Abschlussuntersuchung

Über 30 Tage nach Abschluss der Maßnahmen erfolgte die finale Blutprobenentnahme bei den verbliebenen geimpften Tieren, die unter besonderen Biosicherheitsmaßnahmen gehalten wurden. Die Proben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht und das Ergebnis der Untersuchung der Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte nur negative Proben bzgl. BHV-1.

3.1.4 Probenahme Betrieb C

Nach Aussage des Landwirts findet kein Fremdzukauf statt. Im Jahr 2012 erfolgte der BHV-1-Nachweis über eine Tankmilchprobe. Seitdem wird der Betrieb mit dem zuständigen Veterinäramt saniert. Die Anzahl der Reagenten ist seit Jahren konstant. Eine Untersuchung im Februar 2016 zeigte weniger als 10% Durchseuchung. Von diesen Tieren waren vier belegt. Der späteste Abkalbetermin dieser Tiere war der 19.02.2017. Eine Impfung der Kälber erfolgt intranasal, während alle anderen Tiere im sechsmonatigen Abstand intramuskulär geimpft werden.

Besprochene Maßnahmen bei Projektteilnahme:

- Blutuntersuchung aller Tiere
- Milchuntersuchung der laktierenden Tiere
- Möglichkeit wird vom Landwirt geprüft, die tragenden Tiere nach England zu verkaufen.
- Der Landwirt möchte die trächtigen Tiere nicht euthanasieren lassen
- Die anderen Reagenten werden geschlachtet
- Start der Untersuchungen: nach Klärung des Verbleibs der tragenden Tiere
- Geplantes Zeitfenster: KW 45 für die Blutproben
- Keine Reinigung und Desinfektion des Stalles

Kalkulierter Abschluss der Maßnahmen: Als zeitliche Zielgröße wurde der 10. Dezember 2016 fixiert.

Blutproben

Im November 2016 erfolgte eine Blutprobennahme von allen noch nicht bzgl. BHV-1-untersuchten Tieren. Die eingesandten Proben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung der Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte in der Summe 97,2% negative und 2,8% fragliche Proben. Die untersuchten Jungtiere waren dabei alle negativ bzgl. BHV1-gE.

Zwei Wochen später wurden die fraglichen Tiere erneut über Blutproben, die durch einen vom Landwirt beauftragten Tierarzt gewonnen wurden, durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung der Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte diesmal nur negative Proben.

Parallel wurden die Proben der fraglichen Tiere am 30.11.2016 im FLI in Greifswald mittels drei verschiedener ELISA (gE IDEXX, gE ID Vet und gE Quiagen) auf BHV-1 untersucht. Die Tiere waren in dieser Untersuchung mittels gE ID Vet- und gE Qiagen-ELISA allesamt negativ. Der Test per gE IDEXX-ELISA ergab eine positive, drei negative und zwei fragliche Ergebnisse (siehe zusammenfassend dargestellte Ergebnisse der Testvergleiche unter Punkt 3.3 Ergebnisse Blutuntersuchungen auf Seite 45).

Wieder drei Wochen später wurden die fraglichen Tiere erneut über eine Blutprobe untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung der Proben mittels BHV1-gB (Ak-ELISA) zeigte wieder nur negative Proben. In der wiederholten Untersuchung am 15.12.2016 mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) ergab sowohl negative und wie zu 2/3 auch fraglich getestete Tiere.

Schadnagerbekämpfung

Die Schadnagerbekämpfung erfolgte im Zeitraum Dezember 2016 bis Februar 2017 durch einen professionellen Schadnagerbekämpfer. Während der Bekämpfungsmaßnahmen wurden drei verendete Mäuse und elf verendete Ratten auf dem Betrieb gefunden und an das FLI Greifswald-Riems übersandt.

Abschlussuntersuchung

Am 22.02.2017 erfolgte eine abschließende Blutprobennahme von allen Tieren des Bestandes. Die eingesandten Proben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung der Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte nur negative Proben.

3.1.5 Probennahme Betrieb D

Im Rahmen einer jährlichen Teiluntersuchung gab es im Januar 2016 positive BHV-1 Befunde bei 49 Tieren. Bei einer anschließenden Untersuchung aller Tiere des Bestandes kamen weitere Reagenten hinzu. Alle Tiere sind intramuskulär gegen BHV-1 geimpft. Der Betrieb war zum Zeitpunkt des Erstgespräches gesperrt und es bestand ein Belegungs- und Weideverbot, an das sich der Tierhalter nicht gehalten hat.

Besprochene Maßnahmen bei Projektteilnahme:

- Bestandsräumung
- Geplanter Start in der KW 43
- Zeitnahe Blutuntersuchung (im Fokus KW 43)
- Reinigung und Desinfektion der Stallungen und Gerätschaften
Eine erste Beurteilung im belegten Stall über die prinzipielle Durchführbarkeit einer Reinigung und Desinfektion zeigte einen großen Holzanteil auf, der zudem in mäßiger Qualität vorzufinden war. Eine finale Beurteilung der prinzipiellen Durchführbarkeit ist erst nach vollständiger Räumung möglich.
- Enger Kontakt mit dem Landwirt, da jede Woche Tiere zur Schlachtung gebracht werden sollen und der Schlachthof auch wechseln kann.

Kalkulierter Abschluss der Maßnahmen: bis 10. Dezember 2016

Blutproben

Am 31.10.2016 konnten in Zusammenarbeit mit der den Betrieb betreuenden Tierärztin Blutproben von ca. 43% der Tiere des Bestandes genommen werden. Die eingesandten Proben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung der Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte zu 14% negative und zu 86% positive Proben.

Drei Wochen später wurden weitere 19,8% der Tiere per Blutuntersuchung beprobt. Die Untersuchung der Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte 47,8% negative, 43,5% positive und 8,7% fragliche Proben.

Da der Betriebsleiter mehrfach äußerte, Tiere entgegen der Absprachen und des Maßnahmenplans der FH SWF, der eine Totalräumung des Bestandes als einzig gangbaren Weg vorsieht, im Bestand zu lassen und dies mit den Forschungs- und Umsetzungszielen des Projektes kollidiert, ist am 21.11.2016 dem Landwirt schriftlich und per E-Mail die Kündigung der

Zusammenarbeit im Projekt ausgesprochen worden. Es war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vertretbar, den Aufwand für u.a. unnötige Anreisen zu Schlachthöfen weiter zu leisten. Die Probennahmemöglichkeiten waren bis zu diesem Zeitpunkt sehr gering ausgeprägt und die wissenschaftlichen Ziele des Projektes erschienen nicht mehr erreichbar. Durch ein am gleichen Tag der E-Mail-Zustellung geführtes Telefonat versicherte der Landwirt die vollumfängliche Kooperation, an die sich der Landwirt im Folgenden gehalten hat.

Schlachtungen

Im Zeitraum November bis Mitte Dezember 2016 wurden im Zuge einer Totalräumung bei den Schlachtungen Blutproben und die Schädel einiger Tiere zur Untersuchung gewonnen. Die Blutproben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Die Schädel von sechszwanzig Tieren wurden zur Präparation der Trigeminalganglien an das CVUA-RRW Krefeld verbracht. Das Ergebnis der Untersuchung von 35 Blutproben zeigte insgesamt vierzehn negative, zwanzig positive und eine fragliche Probe.

Tupferproben zum Nachweis von BHV-1

Die Totalräumung des Bestandes war Mitte Dezember 2016 abgeschlossen. Für die anschließenden Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen wurde aufgrund des baulichen Zustands des Stalles eine Reinigung seitens des Landwirts mit anschließender Desinfektion durch die MitarbeiterInnen der FH SWF vereinbart, gefolgt von einem Leerstand des Stalles für mindestens zwei Monate ab Desinfektion. Nach dem Leerstand wurde eine abschließende Desinfektion als einzig sinnvolle Maßnahme erachtet, da der schlechte bauliche Zustand keine gründliche Reinigung zuließ. Die ersten Desinfektionsmaßnahmen seitens der FH SWF fanden am 19.12.2016 in dem Betrieb statt. Hierbei wurden Umgebungstupfer-Proben (Virocult 2 ml) zum BHV-1 Nachweis auf unterschiedlichen Stalloberflächen vor der Desinfektion gewonnen.

Am 09.03.2017 fanden nach dem mehr als zweimonatigem Leerstand die abschließenden Desinfektionsmaßnahmen auf dem Betrieb statt. Zwischenzeitlich hat sich der Landwirt an eine Teilsanierung der Stallwände begeben. Diese waren nur teilweise zufriedenstellend.

Hierzu wurden zudem nach der erfolgten Desinfektion erneut am 09.03.2017 45 Umgebungstupfer-Proben (Virocult 2 ml) zum BHV-1 Nachweis von unterschiedlichen Stalloberflächen genommen und am gleichen Tag gekühlt per Post an das FLI, Greifswald-Insel Riems gesendet.

Die Ergebnisse der Umwelt-Tupferproben zum Nachweis von BHV-1 sind auf S. 53 unter Punkt 3.8 Ergebnisse der Untersuchung von Umwelt-Tupferproben zusammengefasst.

Tabelle 2: Zustand der Ställe zu unterschiedlichen Zeitpunkten ab Leerstand (*Auswahl an Bildern*)

19.12.2016		
04.01.2017		
07.03.2017		

3.2 Betriebe E - H

Diese vier Betriebe wurden aufgrund ähnlicher Strukturen zusammengefasst. In der Summe werden ca. 2.200 Tiere gehalten, die sich wie folgt aufteilen:

1. ca. 2.000 milchliefernde Tiere
2. ca. 90 Tiere zweijährig
3. ca. 150 Tiere einjährig

Insgesamt existierte eine Alt-Reagentenanzahl von ca. 550 Tieren. Tiere würden als Kälber prinzipiell intranasal, während alle anderen Tiere im sechsmonatigen Abstand intramuskulär geimpft würden. Die Impfung von Zukaufstieren erfolgte nicht bei allen Tieren zur Einstallung. Die Anzahl der Reagenten war nach Aussagen der Landwirte seit Jahren stark schwankend. Die letzten Erhebungen bzgl. BHV-1 wurden vor ca. 1 ¼ Jahren durchgeführt.

Es wurden in diesen Betrieben noch laufend Tiere neu in die Herden integriert. Nach HI-Tier waren diese Tiere BHV-1-negativ. Diese Tiere wären nach Aussagen der Landwirte ab Einstallung intramuskulär gegen BHV-1 geimpft worden.

3.2.1 Probennahme

Es erfolgte im Rahmen des Projektes eine Blutprobennahme von allen Tieren, die älter als sieben Monate sind. Die Proben wurden, aufgeteilt nach den jeweiligen Betrieben in Untersuchungsanträgen, durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. In der Summe wurden im November 2016 1.928 Proben analysiert. Das Ergebnis der Untersuchung von 543 Proben mittels BHV1-gB (Ak-ELISA) zeigte neun negative und 534 positive Proben. Das Ergebnis der Untersuchung von 1.913 Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte 635 negative, 1.166 positive und 112 fragliche Proben.

Es konnten aufgrund organisatorischer Mängel der Tierhalter nicht alle Tiere beprobt werden. Listen der nicht beprobten Tiere (n = 132) wurden per E-Mail an die Tierhalter verschickt mit der Bitte um Untersuchung dieser noch fehlenden Tiere durch einen der Hoftierärzte. Diese Untersuchungen wurden nicht durchgeführt und daher mit den erneuten Probenahmen am 01./02.12.2016 verbunden. Zudem wurden Blutproben von 45 Tieren gewonnen, die entweder nicht in dem Standort gemeldet waren, in dem sie sich befanden, oder die in keinem der vier Betriebe in HI-Tier geführt wurden. Eine erneute Prüfung der Liste ergab nach Herausstreichen der Tiere, die falsch gemeldet waren und der Tiere, bei denen ein Schreibfehler in Betracht kam,

nunmehr 15 Tiere, die in keinem der Standorte in HI-Tier geführt wurden. Daher kam es am 14.11.2016 zu einer weiteren E-Mail mit der Bitte, diese Tiere in HI-Tier nachzutragen, damit die Proben einer Untersuchung unterzogen werden konnten. Die korrekte Meldung dieser Tiere erfolgte seitens der Betriebsleiter am gleichen Tag.

Ebenfalls am 07.11.2016 wurden Nasentupferproben von 96 BHV-1-positiven Tieren genommen und bei Raumtemperatur per Post an das FLI Greifswald-Riems gesendet. Die Anzucht per Zellkultur ergab bei ca. 1/3 bis maximal der Hälfte der Kulturen auswertbare Ergebnisse, die alle negativ waren. Die PCR-Auswertung der Proben ergab ebenfalls ein negatives Ergebnis.

Aufgrund der Ergebnisse der ersten Blutuntersuchungen wurden Ende November 2016 die mögliche Vorgehensweise mit den Betriebsleitern, den zuständigen Veterinärämtern und den Hoftierärzten besprochen. Hierbei war eine Aufteilung der Tiere mit dem Ziel, die negativen Tiere räumlich von den positiven und fraglichen Tieren zu separieren, von zentraler Bedeutung:

- Separierung der negativen und fraglichen Tiere von den Reagenten
- Separierung auch bei den hochtragenden Tieren!
- Impfungen intranasal und i.m. nach 4 Wochen bei allen negativen und fraglichen Tieren (Erlaubnis durch das jeweilige Veterinäramt eingeholt)
- Schlachtung der Reagenten, es wurde auf das Einhalten der geltenden Gesetze (u.a. Schlachtung gravider Tiere) durch die Veterinärämter deutlich hingewiesen
- Weitere Blutuntersuchung, geplant Ende November/Anfang Dezember 2016 bei den negativen und fraglichen Tieren
- Milchproben plus Jugularvenenblut bei den Reagenten
- Separierung und Schlachtung der Neu-Reagenten
- R+D in Zusammenarbeit mit Betriebsmitarbeitern und FH SWF (Stall für Stall)
- Umstallung der negativen Tiere in R+D-Abteile
- Wiederholte Blutentnahme noch vor Weihnachten 2016
- Ziel: Ruhe in das hochdynamische BHV-1-Infektionsgeschehen zu bekommen
- Tupferproben bei den negativen und fraglichen Tieren

Zum Zeitpunkt der Blutprobennahme fiel auf, dass die besprochene Separierung der Tiere in positive, fragliche und negative Herden in keinem der Betriebe umgesetzt worden ist. Unter den Gruppen von vermeintlich negativen Tieren befanden sich über 100 positive Tiere, sowie sich in den Gruppen der positiven Tiere ebenfalls negative Tiere aufhielten.

Die Proben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Zudem wurden zum gleichen Zeitpunkt von allen Tieren, bei denen Blutproben gezogen wurden auch Nasentupferproben gewonnen. Alle untersuchten Tiere wurden zudem intranasal gegen BHV-1 geimpft. Die Untersuchungsanträge zusammen umfassten eine Probenanzahl von 710 Blutproben. Das Ergebnis der Untersuchung von 323 Proben mittels BHV1-gB (Ak-ELISA) zeigte 34 negative, 288 positive und einen fraglichen Befund(e). Das Untersuchungsergebnis von 674 Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte 546 negative Proben. Von den Tieren, die am 04.11.2016 negativ getestet worden sind, waren mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zum jetzigen Zeitpunkt 84 Tiere bereits BHV-1 positiv und damit im Zeitraum vom 04.11.2016 bis zum 01.12.2016 serokonvertiert; 44 Tiere zeigten zusätzlich ein fragliches Untersuchungsergebnis und könnten sich somit in Serokonversion befinden.

Am 06.12.2016 wurden in einer Nachuntersuchung weitere 96 Blutproben von einem Hoftierarzt gewonnen. Das Ergebnis der Untersuchung von 35 Proben mittels BHV1-gB (Ak-ELISA) zeigte einen negativen, 34 positive und keinen fraglichen Befund(e). Das Ergebnis der Untersuchung von 95 Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte 47 negative, 37 positive und 11 fragliche Ergebnisse.

Am 08.12.2016 wurden neue Sortierlisten auf Basis der zweiten Blutuntersuchung für die negativen und fraglichen Tiere an die Betriebsleiter verschickt.

Aufgrund der unzureichenden Umsetzung des Maßnahmenplans vom 24.10.2016 bzw. 22.11.2016 wurde ein geänderter Maßnahmenplan erstellt und am 08.12.2016 an die Betriebsleiter geschickt.

Mitte Dezember 2016 erfolgte per E-Mail eine Absprache über die Schlachtung von 88 fraglich getesteten Tieren. Hierzu wurde eine entsprechende Liste der Tiere an die Betriebsleiter verschickt. Die Feststellung des Trächtigkeitsstadiums sollte dabei beachtet werden (s.o.).

Ebenfalls Mitte Dezember 2016 folgten per E-Mail Informationen zu einer Neusortierung der Tiere auf Basis der zweiten Blutuntersuchung in drei der vier Betriebe.

Am 19.12.2016 erfolgten erneute Blutprobennahmen von allen negativen Tieren, die älter als sechs Monate waren. Zudem wurden zum gleichen Zeitpunkt von 650 Tieren, bei denen Blutproben gezogen wurden, auch Nasentupferproben gewonnen. Alle untersuchten Tiere wurden intramuskulär gegen BHV-1 geimpft.

Da sich zum Zeitpunkt der Blutprobenuntersuchungen weiterhin positive Tiere unter den negativen Tiergruppen befanden, kam es am 20.12.2016 zu einer erneuten schriftlichen Aufforderung seitens der FH SWF, diese Tiere aus den negativen Gruppen zu entfernen.

Die Proben wurden durch das CVUA-RRW in Krefeld auf BHV-1 untersucht. Die Untersuchungsanträge zusammen umfassten eine Probenanzahl von 555 Blutproben. Das Ergebnis der Untersuchung von 553 Proben mittels BHV1-gE (Ak-ELISA) zeigte 414 negative, 90 positive und 49 fragliche Proben. Zwei Proben konnten nicht untersucht werden.

Aufgrund des Untersuchungsergebnisses mit 90 neuen BHV-1-positiven Tieren kam es am 23.12.2016 zu erneuten schriftlichen Aufforderungen, die den E-Mails angehängten Neusortierungslisten umzusetzen. Die fälligen Listen der hochtragenden Tiere, die im Maßnahmenplan vom 09.12.2016 mit einer Frist zum 15.12.2016 versehen war und sowohl am 20.12. als auch am 22.12.2016 erneut telefonisch angefragt wurde, lag zu diesem Zeitpunkt nicht vor und wurde ebenfalls per E-Mail erneut mit einer Frist zum 27.12.2016 angefordert. Im Falle eines Verstreichens der Frist wurde eine fristlose Kündigung der Zusammenarbeit angekündigt, da bisher ein äußerst hoher Aufwand für die FH SWF und das FLI vorlagen, ohne wissenschaftliche Untersuchungen an den Tieren vollumfänglich durchführen zu können.

Am 23.12.2016 lag die Liste der tragenden Tiere, die 7,5 Monate und mehr tragend waren vor. Sie beinhaltete 202 Reagenten. Diese Liste umfasste aber nur die Halsbandnummer der Tiere, sodass eine Zuordnung dieser Tiere zur Ohrmarke nicht durch die FH SWF vorgenommen werden konnte.

Am 05.01.2017 lag das Ergebnis der 650 untersuchten Nasentupferproben vom FLI Greifswald-Insel Riems vor. Von den am 21.12.2016 eingegangenen Proben entwickelten vier Tupferproben einen BHV-1 typischen zytopathogenen Effekt in der Zellkultur. Alle vier Isolate wurden in der Immunofluoreszenz-Analyse auf das Vorliegen von BHV-1 Glykoprotein D und Glykoprotein E positiv getestet: In den Tupferproben wurde die Vermehrung von BHV-1 Feldvirus nachgewiesen.

Am 23.01.2016 wurden Milchproben von 54 BHV-1-positiven Tieren gewonnen und zur Untersuchung an das FLI Greifswald-Insel Riems versendet. Die Ergebnisse der Untersuchung der Milchproben sind auf S. 52 unter Punkt 3.7 zusammengefasst.

Schlachtungen und Ganglienproben:

Im Zeitraum vom 23.01.2017 bis 15.02.2017 wurden bei insgesamt 456 Tieren Blut- und Ganglienproben bei der Schlachtung gewonnen. Die Ergebnisse der Untersuchung der Blut- und Ganglienproben sind zusammengefasst für alle Betriebe auf S. 50 ff. unter Punkt 3.6 zusammengefasst.

Reinigung und Desinfektionsarbeiten:

Ab der KW 7 2017 fanden Reinigungs- und Desinfektionsarbeiten seitens der FH SWF in den vier Betrieben statt. Da insgesamt eine Fläche von mehr als 13.500 m² zur Reinigung und Desinfektion stand, wurde nach den Vorreinigungsarbeiten durch die Mitarbeiter des Betriebes systematisch Stall für Stall die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen durch die Mitarbeiter der FH SWF in zwei Schichten durchgeführt.

Zur Kontrolle der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen wurden zu den unterschiedlichen Reinigungs- bzw. Desinfektionsabschnitten (vor Reinigung, nach Reinigung und nach Desinfektion) Umwelttupferproben gewonnen und auf Keimgehalte untersucht. Die gewählten Oberflächen und die zusammengefassten Ergebnisse sind unter Punkt 3.9 Ergebnisse der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen auf S. 54 ff. zusammengefasst.

Untersuchung von Umwelt-Tupferproben auf BHV-1

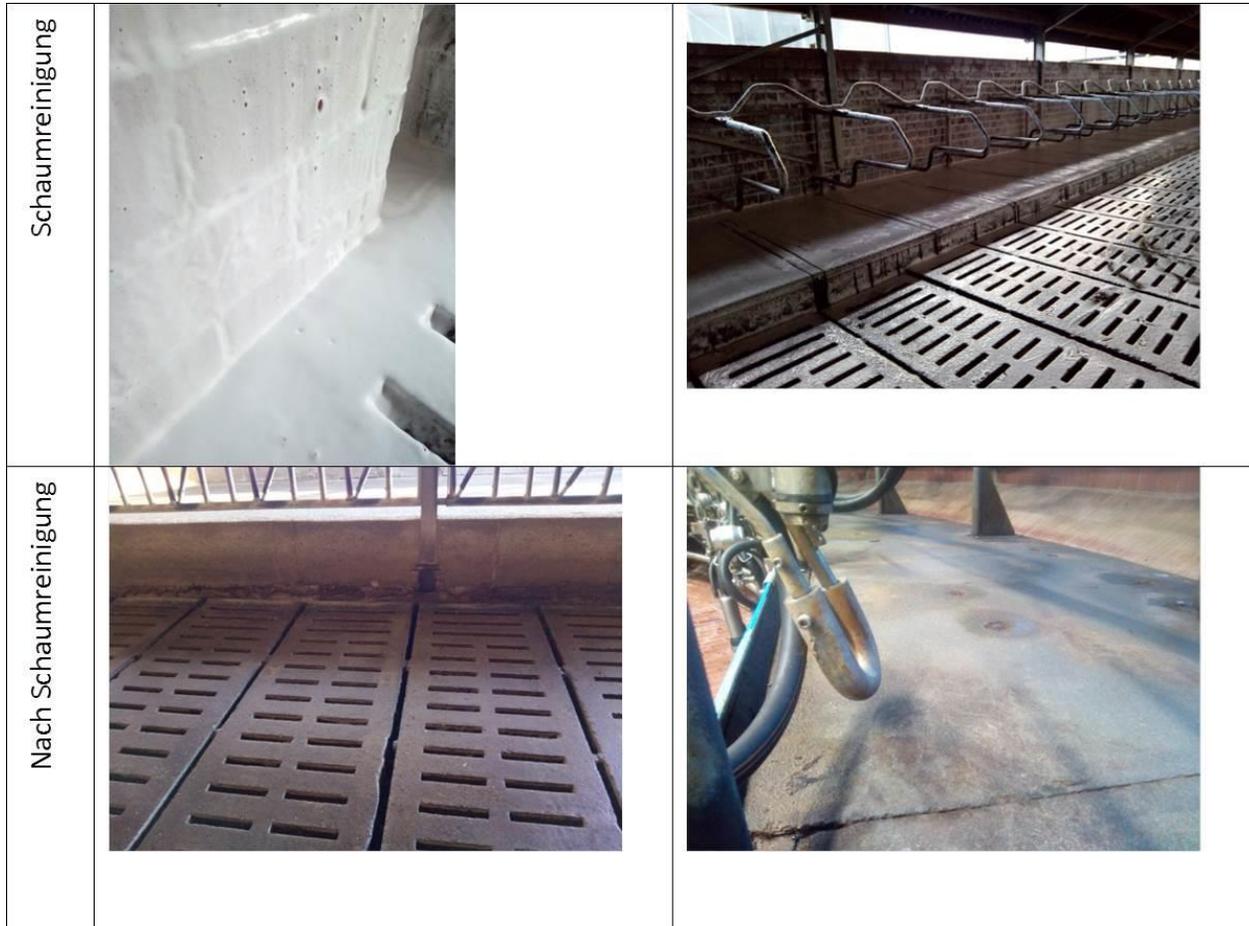
Anfang März 2017 wurden in allen vier Betrieben inklusive Außenstandorte 247 Umgebungstupfer-Proben (Virocult 2 ml) zum BHV-1 Nachweis auf unterschiedlichen Stalloberflächen genommen und gekühlt per Post an das FLI Greifswald-Riems gesendet. In keiner der Tupferproben wurde in der Zellkultur ein BHV-1-typischer zytopathogener Effekt beobachtet.

Tabelle 3: Zustand der Ställe zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Nach Reinigung		
		
		

nach Reinigung
Beispiele schwer zu reinigender Stellen





3.3 Ergebnisse Blutuntersuchungen

Zusammenfassung der Betriebe E-H

Datum	<u>Ergebnis der Blut-US</u>		
	Neg (%)	fragl.	Pos.
04.11.2016	34	6	60
01.12.2016*	78	7	14
19.12.2016*	75	9	16

*nur Blutuntersuchung von Tieren, die in der Untersuchung zuvor als BHV-1-negativ detektiert wurden.

Tabelle 5: Übersicht der Anzahl Tiere mit veränderter Serologie			
Datum	von neg. zu pos.	von neg zu fragl.	von fragl. zu pos.
01.12.2016	52	27	35
19.12.2016	70	44	11
Schlacht-US	23	7	9

3.4 Testvergleich der gE-blocking ELISA-Systeme

Ein BHV-1 Feldviruseintrag in geimpfte Herden kann lediglich mittels einer einzigen Testmethode überprüft werden. Als Impfviren werden Glykoprotein E-Deletionsmutanten eingesetzt, die eine serologische Unterscheidung zwischen Impfung und Feldvirusinfektion durch die fehlende Induktion von gE-Antikörpern ermöglichen. Für die Kontrolle eines Infektionseintrages im Rinderbestand ist eine rasche, zuverlässige und sensitive Erkennung infizierter Tiere durch den Nachweis von Antikörpern gegen gE unerlässlich.

Um eine umfangreiche Vergleichsanalyse der drei in Deutschland zugelassenen Testsysteme für den Nachweis von Antikörpern gegen das Glykoprotein E des BHV-1 durchzuführen, wurden insgesamt 968 Blutproben mit unterschiedlichem Status zeitgleich untersucht. Die Testdurchführung erfolgte nach den Herstellervorschriften, die Farbentwicklung wurde im Tecan infinite F200 pro bestimmt.

Tabelle 6: Zusammenfassende Ergebnisse des Testvergleichs von gE-blocking ELISA Systemen bei Blutuntersuchungen (N = 968)

	alle neg	alle pos	Summe Übereinstimmung	% Übereinstimmung
Platte 1	48	32	80	90,9
Platte 2	57	11	68	77,3
Platte 3	60	21	81	92,0
Platte 4	32	48	80	90,9
Platte 5	20	59	79	89,8
Platte 6	35	47	82	93,2
Platte 7	29	53	82	93,2
Platte 8	38	41	79	89,8
Platte 9	29	50	79	89,8
Platte 10	27	55	82	93,2
Platte 11	23	64	87	98,9
	398	481	79,9	90,8

Die hohe Übereinstimmung aller Testsysteme (Idexx, Qiagen und ID vet) belegt die hohen Qualitätsstandards in der BHV-1 Markerdiagnostik.

Analyse der Abweichungen:

- Im Qiagentest (1stGeneration) wurden Proben vergleichsweise häufiger fraglich statt positiv bewertet (ca. 4,6 % der positiven Proben).
- Im Idexx Test wurden Blutproben vermehrt fraglich statt negativ bewertet. Da bei den Tieren keine Nachuntersuchungen durchgeführt werden können, ist eine abschließende Bestimmung des tatsächlichen Status der Tiere nicht möglich (wahrer Status unklar).
- Bei etwa 4,6 % der positiven Proben kam es zu einer fraglichen oder sogar positiven Beurteilung in einem einzigen Test, während die beiden anderen Ergebnisse reaktiv waren, aber negativ zu bewerten waren (wahrer Status mit hoher Wahrscheinlichkeit positiv).
- Bei ca. 2,3 % der positiven Proben wurden drei unterschiedliche Ergebnisse erzielt: positiv, fraglich und reaktiv aber unter dem Grenzwert (wahrer Status mit höchster Wahrscheinlichkeit positiv).

Bei den Vergleichstestungen traten keine systematischen Schwächen einzelner Testsysteme zu Tage, sondern die Schwankungen betrafen in erster Linie individuelle Proben. Daher unterstreichen die Ergebnisse der Untersuchungen die Empfehlung, in Ausbruchsbeständen mit mindestens zwei gE-Testsystemen zu untersuchen, um eine effizientere und schnellere

Entfernung der tatsächlichen Reagenten zu ermöglichen, oder um Nachuntersuchungen nach Priorität staffeln zu können.

In allen drei Testsystemen kam es auch nach Testwiederholung zu einzelnen klar negativen Bewertungen in Gegenwart von zwei klar positiven Bewertungen durch die beiden anderen Tests. Dies wurde jeweils bei 1 - 2 der insgesamt mehr als 500 positiven Proben beobachtet. Da eine Nachuntersuchung nicht möglich war, bleibt eine abschließende Beurteilung offen. Über eine mögliche Relevanz für die BHV-1 Bekämpfung können ebenfalls zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussagen getroffen werden.

3.5 Ergebnisse Nasentupferproben

B94/16 22-117 = 95 Einzelproben

3x Aktin Wiederholung (**mittel 33,0; min 26,1; max 40,8**) **40,1 und 40,8 wiederholt**

4x gE oder gD singular positiv $cq > 30$; nach Wiederholung der Extraktion 1 Probe sehr schwach gD-positiv, keine der Proben gD und gE doppelt positiv.

Keine Hinweise auf Vermehrung von BHV-1 in der Zellkultur.

B103/16 (1 bis 307) 5 Proben im Pool getestet: 62 Pools

1x Aktin Wiederholung (**mittel 28,6; min 23,4; max 31,8**)

3x singular gE oder gD positiv; in der Wiederholung doppelt negativ.

Pool 25, 43, 59, 60 positiv

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse von Nasentupferproben I.				
Pool-Probe	gD	gE	Einzel-Probe	Anzucht
Pool 25	29,3	25,7	122	positiv ein Tier
Pool 43	no ct	40,0	212 no ct/ 36,2	Anzucht negativ
Pool 59	27,8	38,6	negativ	Anzucht entfällt
Pool 60	29,2	34,1	297	positiv ein Tier

B115/16 5 Proben im Pool getestet: 132 Pools3x Aktin Wiederholung (**mittel 28,2; min 25,0; max 31,9**) **40,3 wiederholt**

13x gE oder gD singularär positiv

Pool 23,39,45,106,129 doppelt positiv

Wiederholung und Auflösung der Testung

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse von Nasentupferproben II.				
Probe	gD	gE	Einzel-Probe	
Pool 1	no ct / wdh no ct	37,7/ wdh no ct	Nr 5	Anzucht positiv ein Tier
Pool 23	36,8	33,6	Nr. 113: 31,4 / 29,7	Anzucht negativ
Pool 36	34,0	30,5	Nr. 178: 31,4 / 29,7	Anzucht positiv ein Tier
Pool 39			Nr. 195: 40,3 / 35,1	Anzucht negativ
Pool 45	40,4	40,3	keine Probe doppelt positiv Nr. 223 no ct/ 36,0	Anzucht falls gE positiv: positiv ein Tier
Pool 74	35,1	no ct	keine Probe doppelt positiv	Anzucht falls gE positiv: negativ
Pool 75	no ct	33,5	Nr. 374: 31,4 / 29,7 nur 1 Probe gD (+)	Anzucht positiv ein Tier
Pool 80	33,6	no ct	nur 1 Probe gD +	Anzucht negativ
Pool 88	31,7	no ct	nur 1 Probe gD ++	Anzucht negativ
Pool 106	36,9	37,7	Nr. 530: 31,8 / 30,6	Anzucht positiv (250µl) ein Tier
Pool 124	33,9	no ct	negativ	Anzucht entfällt
Pool 129	38,5	37,1	Nr. 195: 40,3 / 35,1	Anzucht negativ

3.6 Ergebnisse der Untersuchung der Ganglien

Da bei der Anwendung der artifiziellen Insemination in den Milchviehbeständen dem genitalen Infektionsweg keine nennenswerte Rolle zukommt, konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Präparation und Analyse der Trigemininalganglien.

Es wurden insgesamt Ganglien von 470 Tieren untersucht. Um eine absolut verwechslungsfreie Zuordnung zum aktuellen serologischen Status der Tiere zu gewährleisten, wurden bei der Präparation der Nervenknotten Exsudate oder Muskelproben gewonnen. Trigemininalganglien sind in ein stark ausgebildetes Gefäßnetz eingebettet, was die Gewinnung blutreicher Exsudate ermöglicht. Die serologische Untersuchung von Fleischsaft bzw. Tausaft wird bei zahlreichen Infektionskrankheiten bei verschiedenen Tierarten erfolgreich eingesetzt. Als Beispiel für den zuverlässigen Nachweis einer Herpesvirus-Infektion dient die Analyse von Muskelproben aus dem Zwerchfellpfeiler bei der Aujeszky'schen Krankheit. Begleitend zu den Untersuchungen dieser Studie wurden in Zusammenarbeit mit dem LVI BS/H 250 Muskel-Blut-Paare getestet, um eine geeignete Testauswahl für eine sensitive und spezifische BHV-1 Fleischsaftserologie treffen zu können. Exsudate wurden nach einem Frieren-Tauen-Zyklus aus den Ganglienproben der CVUA-RRW gewonnen und bei 14.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Tausaftproben aus der Muskulatur wurden nach 1-2 Gefrier-Tau-Zyklen nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm abgenommen. Die ELISA-Protokolle wurden nach den Herstellervorschriften für die Analyse von Serum- oder Plasmaproben durchgeführt. Für die Beurteilung wurden die Grenzwerte für Blutserologie übernommen. Generell ist festzustellen, dass die Sensitivität der Analyse von Tausaftproben im Vergleich zu Blutproben geringfügig reduziert ist. Bei Nachweis von BHV-Antikörpern in den konventionellen Testsystemen ergab sich bei den Exsudaten ein vermutlich falsch negatives Ergebnis (Sensitivität 99,8 %), bei den Tausaftproben wurde eine Probe fraglich bewertet.

Das Glykoprotein E des BHV-1 ist ein vergleichsweise schwaches Immunogen. In der Folge sind die Antikörperspiegel im Blut niedriger als vergleichsweise die Antikörperspiegel gegen das Hauptimmunogen gB. Als Folge der BHV-1 Impfung kommt es im infizierten Tier zwar nicht zum kompletten Blockieren der Virusvermehrung, aber dennoch zu einer Abschwächung und zeitlichen Verkürzung der Virusreplikation. Daher sind in geimpften Tieren die gE-Antikörperspiegel vergleichsweise niedrig und es kann sogar zu einer unvollständigen gE-Serokonversion kommen. Folglich ergibt sich bei der vergleichenden Analyse der gE-Antikörper auch ein etwas höherer Anteil divergierender Ergebnisse zwischen Tausaft- und Blutuntersuchung. Die bisherigen Validierungen zeigen, dass bei der Tausaftuntersuchung der

fragliche Bereich erweitert werden sollte. Daher wurde für die Bewertung der Ergebnisse ein fraglicher Bereich von 0,60 < fraglich < 0,80 (Blut 0,70) zugrunde gelegt.

Für die Testung der Exsudate ergaben sich acht fragliche Proben bei erhöhtem Grenzwert, zwei wahrscheinlich falsch negative Ergebnisse (Sensitivität 98,68 %), sowie zwei vermutlich falsch positive Resultate (Spezifität 98,68 %). Analog zeigte sich bei den Untersuchungen der Muskelproben (247): fraglich durch erhöhten Schwellenwert: 38 Stück, 7 falsch negative Proben (Sensitivität 97,17 %) bei 2 falsch positiven Ergebnissen (Spezifität 99,19 %). Da eine Bestimmung des wahren Status der Tiere aufgrund fehlender Nachbeprobungsmöglichkeit nicht erfolgen kann, bleiben diese Ergebnisse unbestätigt.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Eigenschaften der verwendeten Testsysteme im Vergleich Blutserologie/ Fleischsaft Serologie		
Test	Spezifität	Sensitivität
gB Idexx	99,23%	99,0%
Vollvirus Idexx	98,3%	97,7%
gE Idexx	99,2%	92,0%

Die Daten aus dieser Studie wurden im LAB LOEFFLER, Heft 2 2017, Nr. 15 veröffentlicht.

Von 71 ungeimpften Kälbern reagierten 58 Tiere Antikörper- und DNA-positiv. Lediglich bei 6 gE-Ak-positiven Tieren konnte kein virales Genom detektiert werden. Dies kann durch fehlende Latenz, niedrige Genomlast oder auch durch das Vorliegen maternaler Ak begründet sein. Hier bestätigt sich die Beobachtung, dass bei sehr hohem Infektionsdruck ein limitierter Schutz durch passiv erworbene maternale Antikörper induziert wird.

Sämtliche serologisch doppelt negativ getesteten Proben reagierten PCR-negativ (133 Stück). Zwei Untersuchungen sprachen für ein Wiederfinden von latentem Impfvirus. Bei sämtlichen 82 Feldvirus-DNA positiven Proben lag im Untersuchungsverlauf ein positives serologisches (2 x fraglich) vor. Generell konnte in ca. einem Drittel der geimpften Tiere nach gE-Serokonversion auch Viruslatenz nachgewiesen werden. Dies unterstreicht im Gegensatz zu den hohen Wiederfindungsraten bei den passiv immunisierten Kälbern die protektive Wirkung der BHV-1 Markerimpfstoffe durch eine drastische Reduktion der Virusausbreitung innerhalb einer

infizierten Herde (R-Faktor -basic reproductive value <1) und der Unterdrückung der Virus-Reaktivierung.

Abschließend wurden fünf gE-seronegative Kälber aus einer Herde von mehr als 140 Feldvirus-Ak positiven Jungtieren aus Thüringen untersucht. Trotz BHV-1 Infektion in Präsenz hoher Spiegel maternaler Antikörper durch Verfütterung von Mischkolostrum konnte auch hier bei keinem der Tiere ein Carrierstatus nachgewiesen werden.

3.7 Ergebnisse der Milchproben

Die serologische Untersuchung von Milchproben bietet die Möglichkeit einer einfachen und regelmäßigen Beprobung ohne Belastung der Tiere. Als gravierender Nachteil wird das Vorliegen von niedrigeren Antikörperspiegeln als im Blutserum in Kombination mit einer eingeschränkten Sensitivität der gE-blocking ELISAs angesehen. Eine Aufkonzentrierung von Sammelmilchproben und/oder der Einsatz eines neuen indirekten gE-ELISA-Systems könnte sich als kostengünstiges Überwachungswerkzeug anbieten.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen das Vorliegen eingeschränkter Spezifität als auch Sensitivität bei den milchserologischen Untersuchungen auf das Vorliegen von BHV-1 gE-Antikörpern. Serologisch schwach positive einzelne Proben werden nicht erkannt, jedoch werden bei der deutlichen Mehrheit der Proben übereinstimmende Ergebnisse erzielt (79,6%).

Ein Sensitivitätsvorsprung des indirekten Testsystems zeichnet sich ab, muss aber durch die Untersuchung weiterer Proben verifiziert werden.

Die Aufkonzentrierung zeigte überraschenderweise lediglich eingeschränkten Erfolg. In Zusammenarbeit mit Dr. Jens Böttcher vom TGD Bayern und dem Hersteller In3diagnostic wurde eine Überarbeitung des Protokolls sowie der Chemikalienzusammensetzung vorgenommen. Die ersten Chargen der zweiten Testgeneration sind fertiggestellt, daher wird die Untersuchung der Milchproben mit der verbesserten Testversion in naher Zukunft möglich sein.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Mehrzahl der Milchproben der markergeimpften Tiere auch in der Frühphase der Infektion (Serokonversion erfolgte im Projektzeitraum) ein aussagekräftiges Ergebnis erbrachte. Daher wäre besonders in großen Betrieben bei einer BHV-1-Reinfektion eine engmaschige nichtinvasive Beprobung über die Gewinnung von Milchproben empfehlenswert, um eine mögliche Ausbreitung der Infektion im Bestand zu

überwachen. Die Möglichkeiten und Grenzen der Untersuchung von Sammelmilchproben nach Aufkonzentrierung müssen weiterführend geprüft werden.

3.8 Ergebnisse der Untersuchung von Umwelt-Tupferproben

B94/16 1-21 Betrieb B 14.11.2016

4x Aktin Wiederholung (**mittel ct 35,9; min 32,3; max 38,7**)

Alle doppelt BHV-1 negativ

B99/16 1-21 Betrieb B 24.11.2016

0x Aktin Wiederholung (**mittel 33,8; min 30,7; max 38,3**)

Alle negativ

B101/16 1-21 Betrieb B nach R&D 29.11.2016

Nr. 6 fehlt

6x Aktin Wiederholung (**mittel 34,6; min 30,0; max 39,0**)

1x gD singularär positiv $cq > 30$

B107/16 1-32 vom 13.12.2016

1x Aktin Wiederholung (**mittel 34,4; min 29,6; max 40,1**) **40,1 wiederholt**

Alle doppelt BHV-1 negativ

B115/16 1-60 Betrieb D R&D vom 21.12.2016

0x Aktin Wiederholung (**mittel 31,9; min 25,8; max 37,9**)

Alle doppelt negativ

B120/16 1-33 Betrieb B vor R&D vom 19.12.2016

9x Aktin Wiederholung (**mittel 37,8; min 34,9; max 37,9**)

Alle doppelt negativ

B120/16 1-29 Betrieb B nach R&D vom 20.12.2016

6x Aktin Wiederholung (**mittel 37,2; min 33,0; max 39,5**)

Alle doppelt negativ

B26/17 1-247 (235 Tupfer) Betrieb E-H R&D 04.03.2017

21x Aktin Wiederholung (**mittel 35,2/35,6/36,1; min 31,21; max 39,8**)

In 4 Proben wurde kein Aktin-Amplifikationsprodukt detektiert. 10 Proben reagierten zunächst entweder gD oder gE positiv (ct 38,7 bis 41,9). Im Wiederholungsansatz mit neu extrahierter DNA, reagierten die Proben doppelt negativ.

Alle Proben wurden doppelt negativ getestet

B29/17 1-45 Betrieb D R&D

Zellkultur negativ; Tupfer 25 zeigt in beiden Ansätzen verdächtigen cpe, Abklärung mittels PCR: BHV-1 doppelt negativ; Passagen negativ

Ergebniszusammenfassung:

In keiner der Proben konnte in der Zellkultur infektiöses BHV-1 isoliert werden.

Die PCR-Untersuchungen korrelierten vollständig mit den Ergebnissen der Virusanzucht. Der Genomnachweis konnte schnell und automatisiert durchgeführt werden, zeigte sich also für ein zügiges Screening großer Probensätze bestens geeignet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in Zellkultur und des Genomnachweises mittels realtime PCR ergaben vergleichbare Resultate.

Nach fachgerecht durchgeführter Reinigung und Desinfektion konnte weder BHV-1 Genom noch infektiöses Virus nachgewiesen werden. Dabei wurde auch an schwer zu desinfizierenden Stellen und auf porösen Materialien kein Virus nachgewiesen.

3.9 Ergebnisse der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Ausarbeitung sieben unterschiedliche Oberflächenmaterialien (Beton, Metall, Klinker, Fliesen, Lack/Emaille, Holz und Kunststoff/Gummi) in drei Rinderställen auf die Keimdichten zu den unterschiedlichen Reinigungs- und Desinfektionsstufen beprobt und ausgewertet.

Die Auswertung der Proben im Hinblick auf die Gesamtkeimzahlen im Stall auf den verschiedenen Oberflächen zeigt, dass vor der Reinigung Beton ($\bar{x} = 825.000 \text{ KbE/cm}^2$) die höchsten Verunreinigungen aufweist, gefolgt von Klinker ($\bar{x} = 750.000 \text{ KbE/cm}^2$), Fliesen ($\bar{x} = 300.000 \text{ KbE/cm}^2$) und Metall ($\bar{x} = 150.000 \text{ KbE/cm}^2$) (Abb. 5). Nach den Reinigungsmaßnahmen werden diese reduziert auf $\bar{x} = 23.250 \text{ KbE/cm}^2$ (Fliese),

$\bar{x} = 15.000 \text{ KbE/cm}^2$ (Beton), $\bar{x} = 10.500 \text{ KbE/cm}^2$ (Klinker) bzw. $\bar{x} = 300 \text{ KbE/cm}^2$ (Metall). Nach der Desinfektion sind Gesamtkeimzahlen mit $\bar{x} = 10.500 \text{ KbE/cm}^2$ auf Beton am höchsten, gefolgt von Fliesen ($\bar{x} = 1.500 \text{ KbE/cm}^2$), Metall ($\bar{x} = 202 \text{ KbE/cm}^2$) und Klinker ($\bar{x} = 150 \text{ KbE/cm}^2$) (Abb. 4). Die Unterschiede im Probenumfang in den unterschiedlichen Reinigungsabschnitten ergaben sich dadurch, dass ein Großteil der Plate-Count-Agar-Platten zur Bestimmung der Gesamtkeimzahlen von einem Belag überwuchert wurde, der eine Auswertung unmöglich machte. Bei den beprobten Materialien Lack, Holz und Kunststoff war der Umfang an auswertbaren Proben daher so gering, dass auf eine Auswertung bezüglich der Gesamtkeimzahlen verzichtet wurde.

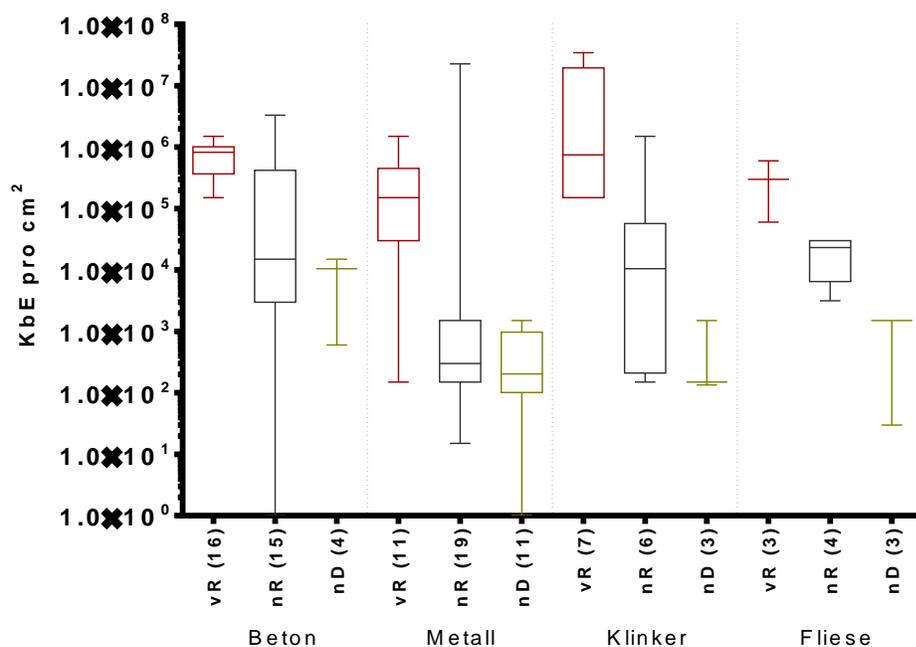


Abb. 4: Anzahl an koloniebildenden Einheiten von Gesamtkeimzahlen vor der Reinigung (vR), nach der Reinigung (nR) und nach der Desinfektion (nD) auf unterschiedlichen Stallobertflächen. Anmerkung: (x) bezeichnet die jeweilige Probenanzahl (n).

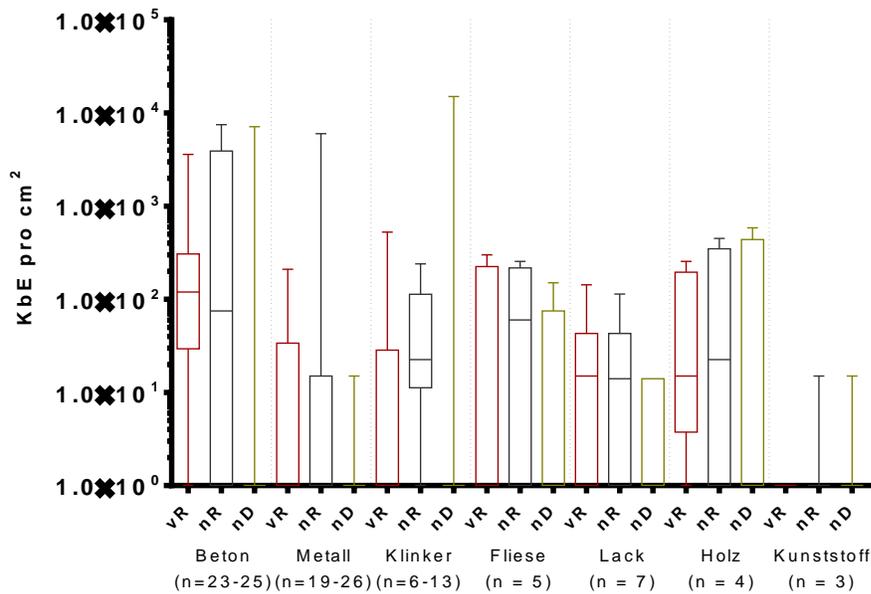


Abb. 5: Anzahl an koloniebildenden Einheiten von coliformen Keimen vor der Reinigung (vR), nach der Reinigung (nR) und nach der Desinfektion (nD) auf unterschiedlichen Stalloberflächen. Anmerkung: Die Probenanzahl (n) ist die Anzahl an Proben in jedem einzelnen Reinigungsschritt.

Bei Betrachtung der Menge an koloniebildenden Einheiten coliformer Keime auf den unterschiedlichen Materialien fällt auf, dass diese schon vor den Reinigungsmaßnahmen relativ gering sind. Die höchsten Werte weisen die beprobten Betonoberflächen mit $\bar{x} = 120 \text{ KbE/cm}^2$ ($0 - 3.600 \text{ KbE/cm}^2$) auf, gefolgt von Holz mit $\bar{x} = 15 \text{ KbE/cm}^2$ ($0 - 255 \text{ KbE/cm}^2$) und Lack mit $\bar{x} = 15 \text{ KbE/cm}^2$ ($0 - 143 \text{ KbE/cm}^2$) (Abb. 6). Bei allen weiteren beprobten Oberflächen liegt der Median der nachgewiesenen Coliformen Keime bei $\bar{x} = 0 \text{ KbE/cm}^2$. Nach den Reinigungsmaßnahmen reduziert sich die Menge an Coliformen Keimen auf Betonoberflächen auf $\bar{x} = 75 \text{ KbE/cm}^2$, während bei anderen Oberflächenmaterialien ein geringfügiger Anstieg zu verzeichnen ist (Klinker $\bar{x} = 23 \text{ KbE/cm}^2$, Fliese $\bar{x} = 60 \text{ KbE/cm}^2$, Holz $\bar{x} = 23 \text{ KbE/cm}^2$). Bei allen weiteren Oberflächenmaterialien, sowie auch auf allen Oberflächen nach den Desinfektionsmaßnahmen liegt der Median der nachgewiesenen Coliformen Keime bei $\bar{x} = 0 \text{ KbE/cm}^2$ (Abb. 5).

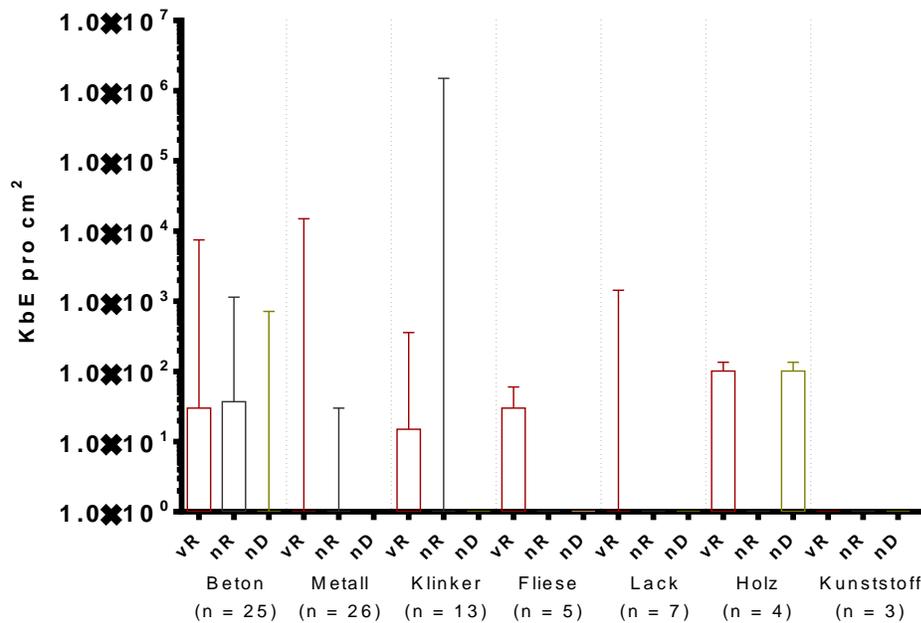


Abb. 6: Anzahl an koloniebildenden Einheiten von *E. coli* vor der Reinigung (vR), nach der Reinigung (nR) und nach der Desinfektion (nD) auf unterschiedlichen Stalloberflächen. Anmerkung: Die Probenanzahl (n) ist die Anzahl an Proben in jedem einzelnen Reinigungsschritt.

Die Menge an *E. coli* ist auf den unterschiedlichen Oberflächenmaterialien zu sämtlichen Zeitpunkten der Reinigungsstufen im Median gleich Null. Die höchsten Werte an *E. coli* vor der Reinigung weisen Metalloberflächen mit 0 – 15.000 KbE/cm² und Betonoberflächen mit 0 – 7.500 KbE/cm² auf (**Abb. 6**). Auf Betonoberflächen finden sich nach der Reinigung 0 – 1.143 KbE/cm², während in allen weiteren Proben nach der Reinigung, bzw. nach der Desinfektion bei allen Oberflächenmaterialien nur vereinzelt *E. coli* nachgewiesen wurde.

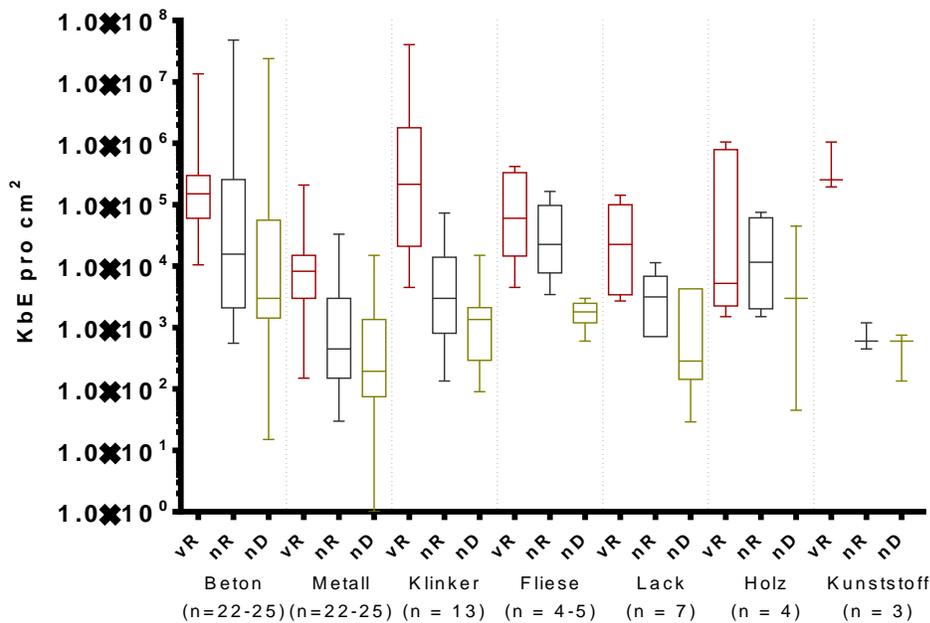


Abb. 7: Anzahl an koloniebildenden Einheiten von Staphylokokken vor der Reinigung (vR), nach der Reinigung (nR) und nach der Desinfektion (nD) auf unterschiedlichen Stalloberflächen. Anmerkung: die Probenanzahl (n) ist die Anzahl an Proben in jedem einzelnen Reinigungsschritt.

Die Auswertung der Proben im Hinblick auf die Anzahl an Staphylokokken im Stall auf den verschiedenen Oberflächen zeigt, dass vor der Reinigung Klinker ($\bar{x} = 214.286 \text{ KbE/cm}^2$) die höchsten Verunreinigungen aufweist, gefolgt von Kunststoff/Gummi ($\bar{x} = 255.000 \text{ KbE/cm}^2$), Beton ($\bar{x} = 150.000 \text{ KbE/cm}^2$), Fliesen ($\bar{x} = 60.000 \text{ KbE/cm}^2$), Lack ($\bar{x} = 22.500 \text{ KbE/cm}^2$), Metall ($\bar{x} = 8.250 \text{ KbE/cm}^2$) und Holz ($\bar{x} = 5.250 \text{ KbE/cm}^2$) (Abb. 8). Nach den Reinigungsmaßnahmen sinkt die Anzahl von Staphylokokken beim Oberflächenmaterial Kunststoff/Gummi um drei dekadische Logarithmusstufen auf $\bar{x} = 600 \text{ KbE/cm}^2$, während sie sich bei dem Oberflächenmaterial Klinker um zwei dekadische Logarithmusstufen auf $\bar{x} = 3.000 \text{ KbE/cm}^2$ und bei Beton, Metall und Lack auf $\bar{x} = 15.750 \text{ KbE/cm}^2$, $\bar{x} = 450 \text{ KbE/cm}^2$ und $\bar{x} = 3.143 \text{ KbE/cm}^2$ reduziert. Nach der Reinigung der Fliesen konnte eine Reduktion an Staphylokokken um das 2,7-fache erreicht werden. Beim Oberflächenmaterial Holz verdoppelt sich die Keimdichte nach den Reinigungsarbeiten auf $\bar{x} = 11.550 \text{ KbE/cm}^2$. Nach den Desinfektionsmaßnahmen waren auf den Oberflächenmaterialien Beton und Holz die höchsten Keimdichten mit jeweils

$\bar{x} = 3.000 \text{ KbE/cm}^2$ zu messen, gefolgt von Fliesen ($\bar{x} = 1.800 \text{ KbE/cm}^2$) und Klinker ($\bar{x} = 1350 \text{ KbE/cm}^2$). Die Materialien Kunststoff, Lack und Metall weisen nach der Desinfektion mit $\bar{x} = 600 \text{ KbE/cm}^2$, $\bar{x} = 286 \text{ KbE/cm}^2$ und $\bar{x} = 195 \text{ KbE/cm}^2$ und verhältnismäßig geringe Keimdichten auf (**Abb. 7**).

Tabelle 10: Veränderung der Logstufe der Gesamtkeimzahl, Coliformer Keime und Staphylokokken auf unterschiedlichen Materialien nach Reinigung bzw. nach Desinfektion.

Arbeitsschritt nach	<u>GSK</u>		<u>Coliforme Keime</u>		<u>Staphylokokken</u>	
	R	D	R	D	R	D
Beton	↓	-	↓	↓	↓	↓
Metall	↓↓↓	-	0	0	↓	-
Klinker	↓	↓↓	↑	↓	↓↓	-
Fliese	↓	↓	↑	↓	-	↓
Lack/Emaile	↓↓↓	k. A.	-	↓	↓	↓
Holz	k. A.	k. A.	-	↓	↑	↓
Kunststoff/Gummi	k. A.	k. A.	0	0	↓↓↓	-

Anmerkung zu den Symbolen: R = Reinigung; D = Desinfektion; ↓ = Reduktion um eine dek. Logstufe; ↑ = Vermehrung um eine dek. Logstufe; - = keine Veränderung der Logstufe; 0 = \bar{x} ist gleich 0

3.10 Schadnager

Die Rolle von Schadnagern bei der Ausbreitung von BHV-1 Infektionsgeschehen wird immer wieder kontrovers diskutiert. Bislang gibt es keine konkreten Hinweise auf eine tatsächliche Bedeutung als aktive Vektoren oder auf passiven Virustransport über längere Distanzen.

Da die gesammelten Schadnager aus Beständen mit teilweise akut-vorliegendes BHV-1 Infektionsgeschehen stammen, wurde eine mögliche Virusexposition der Tiere auf serologischer Basis überprüft.

Tabelle 11: Übersicht über die untersuchten Kleinsäuger (N = 28)

Labor-Nr.	Art	
KS17/656-668	<i>Rattus norvegicus</i>	Wanderratte
KS17/669	<i>Apodemus flavicollis</i>	Gelbhalsmaus
KS17/670	<i>Apodemus flavicollis</i>	Gelbhalsmaus
KS17/671	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/672	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/673	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/674	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/675	<i>Apodemus flavicollis</i>	Gelbhalsmaus
KS17/676	<i>Apodemus flavicollis</i>	Gelbhalsmaus
KS17/677	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/678	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/679	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/680	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/681	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/682	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus
KS17/683	<i>Sorex spp.</i>	Spitzmaus

Tabelle 12: Ergebnisse der Untersuchung von Kleinsäufern mittels BHV-1 gB blocking ELISA (Idexx), N= 28.

Labor-Nr.	OD	PI (%)	Wertung	Betrieb
KS17/656	0,797	-7	negativ	D
KS17/657	0,682	9	negativ	C
KS17/658	0,728	2	negativ	C
KS17/659	0,726	3	negativ	C
KS17/660	0,698	6	negativ	C
KS17/661	0,837	-12	negativ	C
KS17/662	0,686	8	negativ	C
KS17/663	0,719	4	negativ	C
KS17/664	0,703	6	negativ	C
KS17/665	0,667	11	negativ	C
KS17/666	0,734	2	negativ	C
KS17/667	0,689	8	negativ	C
KS17/668	0,775	-4	negativ	B
KS17/669	0,761	-2	negativ	C
KS17/670	0,817	-9	negativ	C
KS17/671	0,757	-1	negativ	B
KS17/672	0,714	4	negativ	B
KS17/673	1,268	-70	negativ	B
KS17/674	1,100	-47	negativ	B
KS17/675	0,878	-18	negativ	B
KS17/676	0,755	-1	negativ	B
KS17/677	1,104	-48	negativ	B
KS17/678	0,762	-2	negativ	B
KS17/679	0,780	-5	negativ	B
KS17/680	0,788	-5	negativ	B
KS17/681	0,834	-12	negativ	B
KS17/682	0,824	-10	negativ	B
KS17/683	0,820	-10	negativ	B

(≥ 55 = positiv; < 45 = negativ; ≥ 45 bis < 55 = fraglich)

Es konnte keinerlei Reaktivität der Proben nachgewiesen werden. Die mitgeführten Negativkontrollen wiesen PI%-Werte von 9 und 10 % auf.

4 Diskussion und Zusammenfassung

4.1 Allgemeines

Die Probennahme von Blut-, Nasentupfer-, Ganglien- und Umgebungstupferproben fand unter angespannten zeitlichen Rahmenbedingungen in den unterschiedlichen Betrieben statt. Hieraus ergaben sich Abweichungen in der Umsetzung der Probennahme und deren Umfang. Insgesamt konnte mit 3.970 Blutproben, 1.062 Nasentupferproben, 470 Ganglienproben und 509 Umgebungstupferproben mehr als ausreichend und mehr als im Forschungsantrag genannte Zahlen zum Untersuchungsmaterial gewonnen werden. Lediglich die Präparation der Sakralganglien war aufgrund der zeitlichen Abläufe der Schlachtprozesse nicht möglich bzw. erwiesen sich die räumlichen Separationsmöglichkeiten als ungeeignet für die zeitlich aufwendigere Ganglienpräparation.

4.2 Nasentupferproben

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Untersuchung von Nasentupfern in der Zellkultur für den Nachweis von BHV-1 eine hochsensitive und geeignete Methode darstellt, insbesondere wenn Isolatgewinnung und Erregertypisierung angestrebt werden.

Die Anzucht im Mikrotiterplatten-Format ist weniger sensitiv als die Inokulierung von größeren Volumina z. B. in Sechslöchplatten oder TC25 Flaschen: infektiöses Virus konnte z. B. aus dem Tupfer 530 aus 250 µl Probe isoliert werden, nicht aber initial aus 2 x 100 µl Tupfermedium. Dennoch zeigt sich die kleinformatische Kultur für den Hochdurchsatz bei der Untersuchung großer Probenzahlen sehr gut geeignet.

Für den BHV-1 Nachweis konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität von Anzucht und Genomnachweis annähernd vergleichbar ist, da das Virus sehr effizient in Zellkultur propagiert werden kann. Darüber hinaus können in Zellkultur verhältnismäßig größere Volumina analysiert werden, wodurch eine höhere analytische Sensitivität erzielt werden kann. Die trifft beispielsweise auf Probe 5 zu, die sowohl in der Pool-PCR negativ reagierte und auch in der Einzel-PCR nur eine singuläre schwach gE-positive Reaktion zeigte, aber in der Zellkultur eindeutig Virusvermehrung unterhielt.

Im Gegenzug gestaltet sich der Genomnachweis bei fortgeschrittener Infektionsdauer in Gegenwart steigender Antikörperkonzentrationen effizienter als die Anzucht. Auch bei den durchgeführten Untersuchungen wurden eindeutig PCR-positive Proben gefunden, die sowohl in mehreren Anzuchtversuchen als auch in zwei weiteren Passagen der Überstände keine Virusvermehrung erkennen ließen. Die PCR-Untersuchung vom Poolproben aus 5 Einzeltupfern zeigte sich als durchaus geeignet, eine akute Infektion im Bestand nachzuweisen.

Die PCR-Analyse ist als hochsensitive Methode schnell, automatisierbar und sensitiv, jedoch erfahrungsgemäß auch anfällig für Kreuzkontamination. Daher sollte immer beachtet werden, dass eine vergleichbar starke positive Reaktion für gD und für gE nachweisbar ist. Bei der Triplex-PCR nach Wernike wird gE etwas effizienter amplifiziert, die Reaktionen sollten aber Unterschied von maximal 1-2 ct-Werten aufweisen. Darüber hinaus scheinen auch vereinzelt falsch positive gD-Reaktionen aufzutreten, die durch eine Wiederholung der Extraktion und PCR-Analyse im Regelfall abgeklärt werden können.

Generell ist, wie in der Amtlichen Methodensammlung empfohlen, ein positives PCR-Ergebnis vorzugsweise mit einer 2. Methode zu bestätigen, z. B. mit dem Virusnachweis in Zellkultur oder dem indirekten Virusnachweis über die Antikörper-Detektion.

4.3 Ganglien

Generell kann auch bei geimpften Tieren mit der hochsensitiven PCR-Untersuchung eine hohe Wiederfindungsrate von latentem BHV-1 Genom in den Ganglien erzielt werden. Die teilweise niedrigen ct-Werte um ct 20 deuten auf das Vorliegen einer akuten Infektion hin. Daher kann die Untersuchung von Trigeminalganglien als geeignete Methode zur postmortalen Abklärung von epidemiologisch unplausiblen BHV-1 Antikörper-Reaktionen empfohlen werden.

Die Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf die Existenz von seronegativen latenten Carriern in den untersuchten Beständen; außerhalb des Projektes wurden 5 (gE-) seronegative Kälber aus einem Bestand von mehr als 200 infizierten Jungtieren untersucht. Auch bei diesen konnte in den Ganglien kein BHV-1 Genom festgestellt werden. Die Daten unterstreichen im Zusammenhang mit epidemiologischen Beobachtungen, dass es unter Alltagsbedingungen im Gegensatz zum kontrollierten Tierversuch extrem selten, wenn überhaupt, zur Generierung von serologisch unauffälligen Virusträgern kommen kann. Dies könnte durchaus auch der deutlichen Verbesserung der serologischen Untersuchungsmethoden geschuldet sein, die seit der Erstbeschreibung der Carrier stattgefunden hat. Davon unberührt bleibt die Feststellung, dass es bei einer starken Immunitätslage nach einer BHV-1 Feldinfektion zu einer unvollständigen gE-Serokonversion kommen kann. Dies bedeutet, dass sich in Einzeltieren die gE-Antikörperspiegel um den grenzwertigen Bereich bewegen. Diese Tiere können je nach Probenentnahmezeitpunkt, Test und Testcharge eine reaktiv-negative, eine fragliche oder sogar eine schwach positive Reaktion zeigen. Dies kann auch bei den Untersuchungen der Ganglien bestätigt werden.

Um das Vorliegen von akuten Infektionen vor der Ausbildung einer gE-Serokonversion möglichst auszuschließen, wurden von den Schlachtköpfen, die auf dem Riems untersucht wurden,

Nasentupferproben entnommen und wie oben beschrieben in der Zellkultur auf Virusvermehrung untersucht. In keiner der Proben wurde infektiöses Virus nachgewiesen.

4.4 Umgebungstupferproben zur Kontrolle der R+D

Im Rahmen dieser Ausarbeitung wurden unterschiedliche Oberflächenmaterialien auf die Keimdichten zu den unterschiedlichen Reinigungs- und Desinfektionsstufen untersucht. Insgesamt liegen die höchsten gemessenen Werte an Gesamtkeimzahlen vor den Reinigungsmaßnahmen auf dem Stallboden und an den Rückwänden der Ställe vor (Oberflächenmaterialien: Beton und Klinker mit $\bar{x} = 825.000 \text{ KbE/cm}^2$ bzw. $\bar{x} = 750.000 \text{ KbE/cm}^2$). Diese Werte liegen unter den Angaben nach Kaske 2008, der nach dem Ausmisten die Keimdichte in rinderhaltenden Betrieben mit $1.000.000 \text{ KbE/cm}^2$ angibt. Nach der Reinigung konnte die Keimdichte im Durchschnitt auf den untersuchten Materialien um 1,8 dekadische Logarithmusstufen reduziert werden, wobei die Reduktion auf den Metall- und Lack/Emaille-Oberflächen aller Wahrscheinlichkeit nach durch die glatte Beschaffenheit am größten war. Beton war durch die raue und poröse Oberflächenbeschaffenheit das Material mit der geringsten Reduktion der Gesamtkeimzahlen durch die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen. Hinzu kommt, dass v. a. die Stallböden aus Beton beschaffen sind, was zusätzlich den hohen Verunreinigungsgrad erklärt.

Die Keimdichten an Coliformen Keimen waren im Vergleich zu den Gesamtkeimzahlen wie zu erwarten deutlich geringer. Höchste Werte wurden wiederum auf dem Stallboden (Material Beton) gemessen. Auf den Oberflächen Klinker und Fliesen (Rückwände und Futtertisch) war nach den Reinigungsarbeiten ein Anstieg der dekadischen Logarithmusstufe zu verzeichnen. Ob dieser Anstieg der Keimzahlen durch Spritzwasser während der Arbeiten, durch verbesserte Wachstumsbedingungen nach den Reinigungsarbeiten durch Feuchtigkeit, oder durch nachträgliche Verunreinigungen (Personen und Tierverkehr) zustande kommen ist unklar. Nach den Desinfektionsmaßnahmen waren auf allen Oberflächenmaterialien bis auf wenige Ausreißer keine positiven Proben an Coliformen Keime mehr nachweisbar. Positive E. coli Nachweise fanden sich v. a. vor den Reinigungsarbeiten auf den Stallböden und Rückwänden (Beton, Klinker), sowie an der Zwischendecke des Tretmiststalls (Holz), wobei der Median der Keimdichten aller Oberflächenmaterialien mit $\bar{x} = 0 \text{ KbE/cm}^2$ schon vor den Reinigungsarbeiten als gering einzuschätzen ist. Die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen reduzierten die Keimdichten auf allen Materialien weiter, sodass nach Abschluss der Maßnahmen lediglich auf dem Betonboden zwei von 28 Proben und in der Zwischendecke (Holz) eine von drei Proben positiv blieben.

Staphylokokken wurden vor den Reinigungsmaßnahmen auf allen untersuchten Oberflächenmaterialien festgestellt. Die höchsten Keimdichten fanden sich an den Stallrückwänden (Klinker), den Liegeflächen (Kunststoffe/Gummi) und den Stallböden (Beton). Nach der Reinigung konnte die Keimdichte im Durchschnitt auf den untersuchten Materialien um eine dekadische Logarithmusstufe reduziert werden, wobei die Reduktion auf den Liegeflächen (Kunststoff/Gummi) mit einer Reduktion um drei Logarithmusstufen durch die glatte Oberflächenbeschaffenheit am größten war. Dies zeigt, dass schon einfache Reinigungsmaßnahmen der Liegeflächen zu einer Verminderung des Risikos einer Übertragung der Erreger und damit zur Mastitisprophylaxe beitragen können. Allerdings sind die Ergebnisse durch die geringe Probenanzahl mit Vorsicht zu interpretieren und als Tendenzen zu werten, die in weiteren Versuchen näher abgeklärt werden sollten. Nach der Desinfektion waren Keimdichten von 100 KbE/cm² [Liegematten (Kunststoff/Gummi), Fressgitter, Trog/Tränke, Trennwand (Metall) und Tränken (Lack)] bis 1.000 KbE/cm² [(Stallböden, Rückwände, Futtertisch (Beton), Rückwände (Klinker), Futtertische (Fliese) und Trennwand, Zwischendecke (Holz))] feststellbar.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die bauliche Struktur der hier untersuchten Rinderställe immer wieder zu großen Herausforderungen während der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen geführt hat. Allen voran ist das Gefälle der planbefestigten Bodenoberflächen in den Ställen zu nennen, welches immer wieder zu stehende Restwassermengen geführt hat. Zum einen mussten diese nach jedem Zwischenschritt der Reinigungsmaßnahmen zeitaufwändig entfernt werden, zum anderen konnte eine erneute Verschmutzung der umliegenden, bereits gereinigten Flächen nicht sicher vermieden werden. Weiter erschwert wurden die Arbeiten zudem durch angetrocknete Verschmutzungen und Krusten v. a. auf den porösen Materialien, die letzten Endes nicht vollständig entfernt werden konnten und damit das Ergebnis negativ beeinflussen. Ebenfalls zu erwähnen sind ein hoher Personen- und Tierverkehr (Tiertransporte und Hofhund) auf den Betrieben, so dass sich eine Keimeintragung bzw. -verschleppung nicht ausschließen lässt. Ein weitere kritisch zu betrachtender Faktor ist bei der Reinigung von Rinderställen ist das Ausbringungsverbot von Gülle außerhalb der Vegetationszeiten und die begrenzte Aufnahmekapazität bestehender Biogasanlagen, sodass die Güllekeller gegebenenfalls nicht geleert werden können. Dies macht eine vollständige Reinigung der Rinderställe unmöglich und birgt immer die Gefahr einer Rekontamination. Trotz dieser hemmenden Faktoren konnte eine deutliche Keimreduzierung der untersuchten Erreger erreicht werden. Eine Anpassung der baulichen Hemmnisse kann in Zukunft zu einer weiteren Steigerung des Reinigungs- und Desinfektionserfolges auf rinderhaltenden Betrieben führen.

4.5 Bewertung der Biosicherheitsmaßnahmen in den Projektbetrieben

Die intensiven Untersuchungen in den Betrieben zeigten, dass kein Betrieb ein umfassendes Biosicherheitskonzept aufgewiesen hat. Es wurden zu großen Teilen einfachste Biosicherheitsmaßnahmen (Kleidungs- und Stiefelwechsel) weder gefordert noch war entsprechendes Ausstattung in den Betrieben vorhanden. Für die Untersuchungen durch die Projektmitarbeiter wurden für jeden Betrieb einzeln Sicherheitsausstattungen angeschafft und nach Arbeitsende gereinigt und ggf. desinfiziert.

Die zum Teil eklatanten Mängel in der Biosicherheit erstreckten sich dabei auf Mängel in der Personalhygiene, mangelhafte Trennung von Fahrzeugen und Gerätschaften, meist uneingeschränkter Zutritten zu den Stallungen, freilaufende Hoftiere.

Neu eingestellte Tiere wurden meist milchliefernd gekauft und am Tag der Anlieferung auf dem Betrieb direkt in die Herde integriert. Blutuntersuchungen wurden auf keinem Betrieb mit Zukaufstieren im Vorfeld unternommen.

4.6 Gewichtung Biosicherheit vs. latente Carriertiere

In der seit Jahren geführten Diskussion zur Ursächlichkeit der BHV-1-Einschleppung in zuvor negativen Beständen wurde neben der Biosicherheit der Zukauf von latent seronegativen Carriertiere als Ursache aufgeführt. Durch eine zuvor durchgeführte Blutuntersuchung wäre der Status der Tiere eindeutig festzustellen, sofern der Betrieb einen negativen Status bzgl. BHV-1 besitzt und somit keine Tiere in Inkubationszeitraum bzw. geimpfte Tiere berücksichtigt werden müssten.

In dieser Studie, die weltweit den größten Umfang an Trigeminalganglien untersucht hat, konnten keine Carriertiere detektiert werden. Auf Basis des Untersuchungsumfanges ist davon auszugehen, dass das Risiko dieser Viruseinschleppung in BHV-frei Bestände als äußerst unwahrscheinlich anzusehen ist. Nicht überprüft werden konnte, ob das postulierte Ereignis latent seronegativer Carriertiere so niedrig ist, dass selbst die in dieser Studie untersuchten Tierzahlen nicht ausreichend waren. In der Summe kann selbst unter dieser Betrachtung dieser Infektionsweg als weiterhin höchst unwahrscheinlich angesehen werden.

Die dokumentierten eklatanten Mängel bzgl. Biosicherheitsmaßnahmen sind für die BHV-1-Einschleppung als ursächlich anzusehen, da gegen elementare Regeln zur Biosicherheit verstoßen wurde. Es bleibt an dieser Stelle zu hoffen, dass zukünftig verbindliche Regeln zum Schutz von

Rindern getroffen werden, damit sich diese Form der Erregereinschleppung deutlich reduzieren lässt. Die Unterbrechung der Infektionsketten im Geflügel- und Schweinebereich durch entsprechende Verordnungen habe deutliche Reduktionen gezeigt.

4.7 Betrachtung der BHV-1-Impfung und Bestandsräumung

Die Untersuchungen zeigten sehr deutlich, dass die Ergebnisse von Busch et al. (1998) und Straub (2001) bestätigt werden konnten, dass die Impfung nicht vor weiterer Virusausscheidung schützt und somit BHV-1-negative Tiere nicht geschützt werden können. Die Serokonversion geimpfter Tiere innerhalb weniger Tage bzw. Wochen ist überdeutlich.

Die Sinnhaftigkeit der Impfung ist nur in Artikel-9-Regionen gegeben, wenn Stressfaktoren, die eine Reaktivierung begünstigen, konstant niedrig gehalten werden. In Artikel-10-Regionen ist die Impfung keine adäquate Methode, wenn z.B. in der direkten Nähe der geimpften Tiere Reagenten standen. In einem Beispiel konnte durch konsequente Änderung der Biosicherheit und entsprechend gute Umsetzung in der Tagesroutine die Infektion von geimpften BHV-1-negativen Tieren vermieden werden. Einschränkend bleibt zu berücksichtigen, dass diese Tiere in einem separaten Stall und somit getrennt von der übrigen Population gehalten werden konnten.

Es bleibt fraglich, ob dieser Erfolg unter den angegebenen Rahmenbedingungen bei Teilräumungen in anderen Beständen möglich ist. Dies ist im Einzelfall abzuwägen und in akut verlaufenden BHV-1-Geschehen nur durch sehr engmaschige Untersuchung des Blutstatus (Untersuchungsintervall weniger als eine Woche), zügige Trennung der positiv und fraglich detektierten Tiere und unter sehr hohen Biosicherheitsmaßnahmen als sinnvoll einzustufen. Sind diese Rahmenbedingungen nicht gegeben, ist die komplette Bestandsräumung als sinnvoller einzustufen.