



Aus dem Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Linz<sup>1</sup> und dem Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling<sup>2</sup> der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH sowie der Besamungsanstalt Klessheim<sup>3</sup> der Kammer für Land- und Forstwirtschaft Salzburg

## Nachweis einer persistierenden Infektion des Genitaltraktes mit dem Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV) bei einem nicht immuntoleranten Besamungstier

M. DÜNSER<sup>1</sup>, M. ALTMANN<sup>1</sup>, J. DENGGE<sup>3</sup>, M. EICHINGER<sup>2</sup>, A. LOITSCH<sup>2</sup>, S. REVILLA-FERNÁNDEZ<sup>2</sup> und H. SCHWEIGHARDT<sup>1</sup>

eingelangt am 13.4.2005  
angenommen am 27.9.2005

**Schlüsselwörter:** Pestivirus, Bovines Virus Diarrhoe Virus, Stier, Samen, PCR.

**Keywords:** pestivirus, bovine viral diarrhoea virus, bull, semen, PCR.

### Zusammenfassung

Bei einem 14 Monate alten Besamungstier wurde im Rahmen von Routineuntersuchungen eine Serokonversion gegen BVDV beobachtet. In weiterfolgenden Untersuchungen konnte eine persistierende Infektion des Genitaltraktes mit BVDV über einen Zeitraum von 3 Monaten bis zur Schlachtung des Tieres nachgewiesen werden. Parallel dazu durchgeführte Untersuchungen zum Nachweis einer Virämie von BVDV im Blut verliefen im gesamten Untersuchungszeitraum negativ. Mögliche Konsequenzen für die BVDV-Bekämpfung und methodische Ansätze zur Diagnostik von BVDV aus dem Samen werden diskutiert.

### Summary

**Localised persistent infection of the genital tract with bovine viral diarrhoea virus in an immunocompetent bull**

### Introduction

Persistently with bovine viral diarrhoea infected animals are characterized by virus shedding without of developing corresponding antibodies after fetal infection. Postnatal infection with BVDV normally leads to transient viraemia and response of specific antibodies with further elimination of the virus. This case study reports about the findings in a bull with a localized BVD infection of the genital tract and continuously virus shedding in the semen after postnatal infection.

### Methods and results

Seroconversion of BVDV antibodies was detected during a routine examination at a breeding station in a 14 month old bull. Following examinations of blood for BVDV by antigen ELISA and RT-PCR remained negative for a period of 3 months, whereas virus could be detected by virus isolation and RT-PCR in the semen. After slaughtering the bull BVDV specific RNA was detected by RT-PCR in testis, epididymis and accessory glands.

### Conclusion

Infection with BVDV in bulls may lead to a sequestral persistence of the virus in the genital tract and to virus shedding via semen.

Abkürzungen: AGES = Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH; BHV-1 = Bovines Herpesvirus Typ 1; BVD = Bovine Virus Diarrhoe; BVDV = Bovines Virus Diarrhoe Virus; ERL = Enzootische Rinderleukose; EU = Europäische Union; KB = künstliche Besamung; L = *Leptospira*; MDBK = Madin Darby Kidney-Zellen; nzp = nichtzytopathogen; OD = optical density; OIE = Office International des Epizooties; PI = persistent infiziert; RNA = Ribonukleinsäure; RT-PCR = Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion; SNT = Serumneutralisationstest; TCID = tissue culture infective dosis; VI = Virusisolierung

## Einleitung

Die Bovine Virus Diarrhoe (BVD) wird durch ein Pestivirus aus der Familie der Flaviviridae verursacht und zählt weltweit zu den wirtschaftlich bedeutendsten Infektionskrankheiten des Rindes (MURPHY et al., 1995). Das Spektrum klinischer Manifestationen mit dem Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV) ist äußerst vielfältig. Neben Fruchtbarkeitsstörungen können BVDV-Infektionen vor allem gastrointestinale bzw. respiratorische Erkrankungen verursachen (HOUE, 1999). Die Bedeutung dieser Rinderseuche wird durch die intensiven Bestrebungen verdeutlicht,

mittels Bekämpfungs- oder Vakzinationsmaßnahmen den wirtschaftlichen Schaden zu minimieren (BROWNLIE u. MOENNIG, 2004).

Eine besondere Schlüsselrolle in der Epidemiologie der BVD kommt dabei den sogenannten persistent mit dem BVDV infizierten (PI) Tieren zu, die aufgrund einer fetal erfolgten Infektion mit nicht zytopathogenem (nzp) Virus zwischen dem 40. und 120. Trächtigkeitstag eine zeitlebens andauernde Immuntoleranz gegen das BVDV aufweisen und kontinuierlich große Mengen an BVDV ausscheiden (MOENNIG u. LIESS, 1995; BECHER et al., 2001; PETERHANS et al., 2004).

Mit zunehmender Entwicklung des fetalen Immunsy-

stems erfolgt danach eine aktive Auseinandersetzung mit dem Virus, was die Elimination des Erregers und die Ausbildung präkolostral nachweisbarer Antikörper zur Folge haben kann (KAHRS, 2001; STOKSTAD et al., 2003).

Die postnatale Infektion immunkompetenter Rinder hingegen verläuft zeitlich begrenzt und verursacht deutlich geringere Virusausscheidung. Nach Haftung und Vermehrung des Erregers an der Eintrittspforte kommt es nach dem 2. bis 4. Tag post infectionem zur transienten Virämie und einer systemischen Virusvermehrung in verschiedenen Organsystemen, die bis zum 11. Tag post infectionem andauert (MILLS u. LUGINBUHL, 1968; ROHDE u. LIESS, 1970). Der klinische Verlauf der postnatalen Infektion ist abhängig vom Virusstamm, der Konstitution des Tieres, dem Auftreten von Sekundärinfektionen sowie einer Reihe zusätzlicher Faktoren, wie beispielsweise Fütterungs- oder Haltungsbedingungen. Humorale und zelluläre Immunantwort führen zur Elimination des BVDV, wobei ab dem 7. Tag Antikörper gegen das BVDV nachweisbar sind. Der maximale Antikörpertiter wird ca. 7 Wochen post infectionem erreicht (SANDVIK, 2004).

Unterschiedliche Modelle zur BVD-Bekämpfung wurden entwickelt, wobei allen Programmen zur Eradikation letztendlich die Eliminierung der PI-Tiere zugrunde liegt (LINDBERG u. ALENIUS, 1999).

Da über alle Körpersekrete und Exkrete BVDV ausgeschieden werden kann, kommt der Untersuchung von Besamungsstieren bzw. Rindersperma eine besondere Bedeutung zu. Die Untersuchungen und diesbezügliche Maßnahmen wurden auch innerhalb der Europäischen Union (EU) einer gesetzlichen Regelung (RL 88/407/EWG zuletzt geändert durch RL 2003/43/EG) („Spermarichtlinie“) unterzogen.

Im Rahmen dieser Falldarstellung einer außergewöhnlichen BVDV-Infektion bei einem Besamungsstier soll auf die besondere Problematik der BVDV-Ausscheidung über das Sperma hingewiesen werden. Überdies werden methodische Ansätze zur Diagnostik von BVDV aus Sperma diskutiert und vorgestellt.

## Fallbericht

### Vorbericht

Ein Stier der Rasse Pinzgauer mit dem Namen „Gandi“ wurde im Alter von 14 Monaten an die Besamungsanstalt Klessheim verbracht und in der dortigen Quarantänestation separiert eingestellt. Zum Ausschluss viraler und bakterieller Infektionskrankheiten erfolgte vorerst die Einsendung von Blutproben zur serologischen Untersuchung an die Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES). Eine Präputialspülprobe zur Feststellung von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* und *Tritrichomonas foetus* wurde ebenfalls an die AGES übermittelt.

### Labordiagnostik

Die Eingangsuntersuchung umfasste die serologische Untersuchung mit kommerziellen ELISA-Systemen auf Antikörper gegen *Brucella abortus* (Fa. Bommeli, Liebefeld-Bern, Schweiz), Enzootische Rinderleukose (ERL) (Fa. Bommeli, Liebefeld-Bern, Schweiz), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Institut Pourquier, Mont-

pellier, Frankreich) und Bovines Herpes Virus Typ 1 (BHV-1) (Fa. Idexx, Westbrook, Maine, USA). Die Untersuchung auf Antikörper gegen 8 verschiedene *Leptospira* (*L.*) Sero-vare (*L. australis*, *L. canicola*, *L. copenhageni*, *L. grippityphosa*, *L. hardjō*, *L. pomona*, *L. saxkōbing*, *L. tarassovi*) wurde mit der Mikroagglutinations-Lysis-Methode nach BOLIN (2000) durchgeführt.

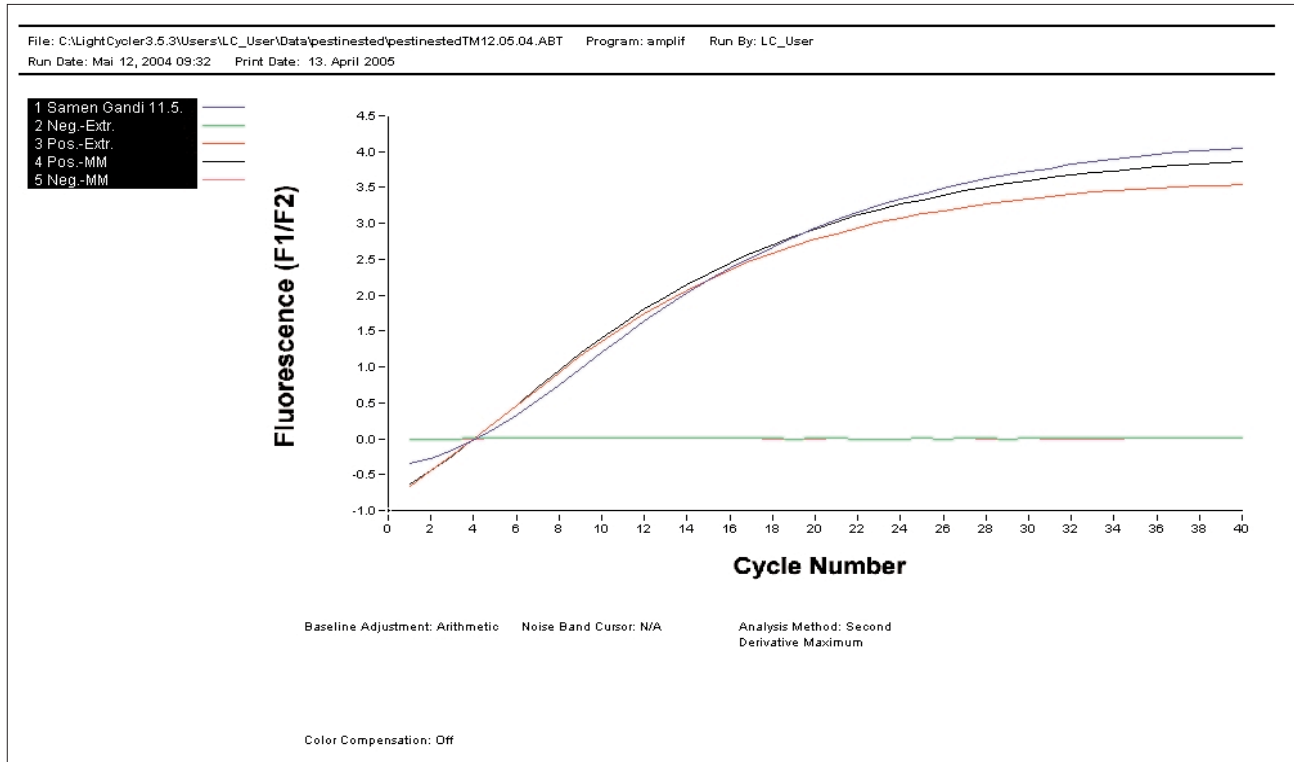
Zur Abklärung auf BVDV-Antigen kamen der HerdCheck Antigen Serum ELISA sowie der HerdCheck Antigen Leukocyte ELISA der Fa. Idexx (Fa. Idexx, Westbrook, Maine, USA) an der Blutprobe zum Einsatz. Die Bestimmung der BVDV-Antikörper erfolgte mit dem Svanovir ELISA der Fa. Svanova Biotech (Uppsala, Schweden).

Im Zuge der Erstuntersuchung verliefen alle serologischen Untersuchungen sowie die Untersuchungen auf *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* und *Tritrichomonas foetus* negativ. Nach 3 Wochen in der Quarantänestation erfolgte eine neuerliche Einsendung einer Blut- und Präputialspülprobe zur Wiederholung und Bestätigung der Ergebnisse der Erstuntersuchung. Sämtliche Untersuchungen wurden mit den selben Testverfahren im selben Labor durchgeführt. Während auch in der zweiten Untersuchung keine Antikörper gegen *Brucella abortus*, ERL, BHV-1, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* und Leptospiren nachgewiesen werden konnten, führte die Untersuchung im Svanovir BVDV-Antikörper-ELISA zu einem positiven Ergebnis. Mit einem OD (optical density)-Wert von 0,446 lag das Ergebnis deutlich über dem cut-off-Wert von 0,25. Ein darauf eingeleiteter Serumneutralisationstest (SNT) mit dem BVDV-1 Stamm „NADL“ (NVSL, Ames, Iowa, USA; 100 TCID<sub>50</sub> auf Madin Darby Kidney-Zellen, MDBK) war ebenfalls mit einem Titer von 1:64 als positiv zu bewerten (MAYR et al., 1977). Die BVDV-Antigen Untersuchung an der Blutprobe auf E<sup>RNS</sup> bzw. p80 mit den 2 verschiedenen ELISA-Systemen der Fa. Idexx erbrachte ein negatives Ergebnis.

Nach 2 Wochen erfolgte eine neuerliche Blutentnahme und Einsendung, wobei mit Ausnahme des BVDV-Antikörper-ELISAs alle anderen Untersuchungen negativ verliefen. Der Svanovir BVDV-Antikörper-ELISA wies mittlerweile einen deutlichen Anstieg des OD-Wertes auf 1,053 auf. Die ebenfalls durchgeführten Untersuchungen der Blutprobe mittels ELISA der Fa. Idexx auf E<sup>RNS</sup> bzw. p80 spezifisches BVDV-Antigen verliefen negativ. Eine parallel dazu durchgeführte Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) zum Nachweis Pestivirus-spezifischer Ribonukleinsäure (RNA) in der Blutprobe zeigte ebenfalls ein negatives Ergebnis. Die RT-PCR wurde unter Verwendung des kommerziellen High Pure Viral RNA Kits (Fa. Roche, Wien) und der Primer 324 und 326 (Tab. 1), wie von DÜNSER et al. (1999) beschrieben, durchgeführt.

In weiterer Folge wurden eine Samen- sowie eine Blutprobe des Stieres zur RT-PCR Untersuchung auf BVDV an die AGES gesandt. Die RT-PCR wurde nach Extraktion viraler RNA mittels High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Fa. Roche, Wien) als „nested“ Realtime RT-PCR mit einem Perkin Elmer 2400 Thermocycler (Fa. Applied Biosystems, Wien) und einem Lightcycler 1.0 (Fa. Roche, Wien) unter Verwendung Pestivirus-spezifischer Primer und einer Pestivirus-spezifischen TaqMan Sonde (Tab. 1) durchgeführt (DÜNSER et al., 1999; GIVENS et al., 2003 a,b; GAEDE et al., 2005).

Mit dem angewandten Realtime RT-PCR Verfahren



**Abb. 1:** Auswertung einer „nested“ Realtime RT-PCR Untersuchung mit dem Lightcycler 1.0: 1 = Samenprobe des Stieres „Gandi“ (ct-Wert 5,183); 2, 5 = Negativkontrollen; 3, 4 = Positivkontrollen (ct-Werte 5,003 bzw. 4,850) (Der ct-Wert [threshold cycle] drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenz in der Realtime PCR detektiert wird.)

konnte Pestivirus-spezifische RNA im Samen nachgewiesen werden (Abb. 1). Eine parallel dazu durchgeführte RT-PCR Untersuchung einer Blutprobe wie oben beschrieben, verlief wiederum negativ.

Zur Virusisolierung (VI) wurde der Samen 1:10 verdünnt und auf MDKB- bzw. Kälberlungen-Zellsuspensionen (Friedrich Löffler Institut, Insel Riems, Deutschland) inokuliert. Die Methodik der VI erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben der OIE (EDWARDS et al., 2000). Nachdem kein zytopathischer Effekt auftrat, erfolgte nach einem Gefrier-Auftau-Zyklus eine Passagierung, welche ebenfalls keinen zytopathischen Effekt ergab. Mit dem monoklonalen C16 Antikörper (Fa. Bommeli, Liebefeld-Bern, Schweiz) gelang allerdings der Nachweis von nzp BVDV mittels Peroxidasefärbung.

Zur Bestätigung der positiven Ergebnisse am Samen wurde eine weitere Samenprobe 6 Wochen später eingesandt und wiederum mittels „nested“ Realtime RT-PCR Verfahrens, wie oben beschrieben, untersucht. Erneut konnte Pestivirus-spezifische RNA im Samen nachgewiesen werden.

In der parallel dazu durchgeführten Blutuntersuchung wurden im Svanovir ELISA wiederum Antikörper gegen BVDV nachgewiesen.

Unter Berücksichtigung der seuchenhygienischen Vorgaben der RL88/407/EG wurde der Stier aufgrund einer persistierenden BVDV-Ausscheidung über den Samen nach 3 Monaten aus der Quarantänestation der Besamungsanstalt Klessheim verbracht und auf Wunsch des Tierbesitzers der Schlachtung zugeführt.

Der Genitaltrakt des Stieres wurde mit dem von DÜNSER et al. (1999) beschriebenen RT-PCR Verfahren unter Verwendung der in Tab. 1 angeführten Primer 324 und 326 auf Pestivirus-spezifische Nukleinsäure untersucht. Die Extraktion viraler RNA erfolgte mit dem High Pure Viral RNA Kit (Fa. Roche, Wien) nach Homogenisation des Gewebes mittels Stomacher (Fa. Seward, London, England).

Pestivirus-spezifische RNA konnte im rechten Hoden, rechten Nebenhoden, Samenstrang sowie der Prostata nachgewiesen werden. Der linke Hoden und Nebenhoden waren in der RT-PCR negativ.

Die Sequenzierung der RT-PCR Produkte erfolgte unter Verwendung der in Tab. 1 angeführten Primersequenzen mittels ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems, Wien). Im Abgleich mit der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; last access: 13.10.2005) konnte eine hundertprozentige Übereinstimmung mit den BVDV Typ 1 Stämmen MV69CB/95 (Accession number U97466) und MV39CB/95 (Accession number U97465) nachgewiesen werden. Es handelt sich beim Stier „Gandi“ daher um einen Virusstamm vom Typ BVDV 1 d.

## Diskussion

Die während der Quarantäne nachgewiesene Serokonversion gegen BVDV bei gleichzeitig negativem Nukle-

**Tab. 1:** Sequenzen und Anwendungsbereiche der Pestivirus-spezifischen Primer sowie TaqMan Sonde

Pestivirus-spezifische Primer und TaqMan Sonde (5'-UTR)	Fragment	Anwendung	Referenz
Pesti 3 CCT GAG TAC AGG RTA GTC GTC A Pesti 4 GGC CTC TGC AGC ACC CTA TCA	171 bp	innere Primer für die Realtime „nested“ RT-PCR in Verbindung mit der Sonde TQ-Pesti	HYNDMANN et al. (1998)
324 ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 326 TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC	288 bp	äußere Primer für die Realtime „nested“ RT-PCR	VILCEK et al. (1994)
TQ-Pesti TGC YAY GTG GAC GAG GGC ATG C	-	doppelt markierte TaqMan Sonde (5'-FAM und 3'-TAMRA)	GAEDE et al. (2005)

insäure- und Antigennachweis im Blut spricht beim Stier „Gandi“ für eine postnatale, akute und transiente Infektion mit BVDV. Aufgrund der Serokonversion bei gleichzeitig fehlendem Antigennachweis im Blut können eine Immuntoleranz gegen BVDV und eine persistierende Virämie mit dem BVDV ausgeschlossen werden. Es handelt sich aufgrund der über einen längeren Zeitraum nachweisbaren Virusausscheidung über den Samen vielmehr um eine auf den Genitaltrakt beschränkte, persistierende Infektion eines an sich immunkompetenten Stieres.

Die während einer akuten Infektion über den Samen andauernde transiente Virusausscheidung von BVDV wird in der Literatur mit maximal 2 Wochen angegeben (WHITMORE et al., 1978; PATON et al., 1989; KOMMISRUDE et al., 1996). Erstmals wurde von VOGES et al. (1998) in Neuseeland bei einem nicht immuntoleranten Besamungsstier namens „Cumulus“ eine 11 Monate lange Virusausscheidung über den Samen dokumentiert. Nach Schlachtung des Stieres im Alter von 22 Monaten konnte aus den Hoden erfolgreich nzp BVDV angezüchtet werden, während die Virusisolierung aus akzessorischen Geschlechtsdrüsen bzw. sonstigen Organen und Blutproben negativ verlaufen war.

Da der Stier „Gandi“ aus seuchenhygienischen Gründen für einen Zuchteinsatz nicht geeignet war und daher aus der Quarantänestation der Besamungsstation verbracht werden musste, beschränkt sich unser Beobachtungszeitraum der BVDV-Ausscheidung über den Samen auf etwa 3 Monate. Aufgrund der postmortal nachgewiesenen BVDV-Infektion von Hoden, Nebenhoden sowie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen erscheint jedoch eine über diesen Zeitraum hinausgehende Virusausscheidung als gesichert.

Während bei PI Tieren erhebliche Viruskonzentrationen von  $10^4$  bis  $10^7$  TCID<sub>50</sub>-ml<sup>-1</sup> über den Samen ausgeschieden werden, liegt die Viruskonzentration im Samen akut und transient infizierter Tiere bei lediglich 5 bis 75 TCID<sub>50</sub>-ml<sup>-1</sup> (KIRKLAND et al., 1991; BIELANSKI et al., 1992;

GIVENS et al., 2003b). Im Falle der persistierenden Samenausscheidung beim Stier „Cumulus“ betrug die Viruskonzentration weniger als  $10^{3,3}$  TCID<sub>50</sub>-ml<sup>-1</sup> (VOGES et al., 1998).

Die Auswirkungen einer genitalen Infektion mit dem BVDV bezüglich Fertilität und möglicher Entstehung von PI-Kälbern sind sowohl bei der persistierenden als auch bei der akuten transienten Infektion äußerst vielfältig. PI-Stiere weisen häufiger verminderte Spermiedichte bzw. Spermiedefekte und herabgesetzte Motilität auf, was eine erheblich reduzierte Fertilität zur Folge hat (REVELL et al., 1988; FRAY et al., 2000). Trotz hoher Viruskonzentration im Ejakulat können jedoch manche PI Stiere Samen von akzeptabler Qualität produzieren und sogar klinisch gesunde Kälber zeugen (BARLOW et al., 1986; KIRKLAND et al., 1991). In einem von MEYLING u. JENSEN (1987) durchgeführten Übertragungsversuch mit Samen eines PI-Stieres brachten alle 12 belegten Tiere klinisch unauffällige Kälber zur Welt, wobei ein Kalb davon ebenfalls persistent mit dem BVDV infiziert war. Bei akuten transienten BVDV-Infektionen kann die Samenqualität vermindert sein, was zu Fertilitätsstörungen führen kann. Auch die Geburt von PI-Kälbern kann die Folge sein (KIRKLAND et al., 1997). Bei Inseminationsversuchen mit Samenportionen des nicht virämischen, jedoch über den Samen BVDV ausscheidenden Stieres „Cumulus“ (VOGES et al., 1998) konnte in einer von 3 belegten Kalbinnen eine systemische BVDV-Infektion erzielt werden (NISKANEN et al., 2002).

Die Bedeutung des Samens als Infektionsquelle für BVDV wurde in der RL 88/407/EWG, zuletzt geändert durch die RL 2003/43/EG des Rates, gesetzlich geregelt. So muß gemäß Anhang B, Kapitel II, 1.e) der RL 2003/43/EG nach Serokonversion gegen BVDV bei Besamungsstieren der Samen entweder vernichtet oder aber auf Virus untersucht werden. Ausschließlich negativ getesteter Samen darf in Verkehr gebracht werden. Als Untersuchungsverfahren zum Nachweis von BVDV im

Samen schreibt die RL 2003/43/EG in Anhang B, Kapitel I, 1f) als Untersuchungsmethoden die Virusisolierung oder einen Antigen-ELISA vor. Da derzeit kein kommerziell erhältliches ELISA-System für den Antigen Nachweis von BVDV im Samen verfügbar ist, kommt für die Testung von BVDV im Samen lediglich die Virusisolierung in Betracht. Da das Seminalplasma jedoch viruzide bzw. zytotoxische Eigenschaften aufweist, kann die Virusisolierung aus Samen zu falsch negativen Ergebnissen führen (REVELL et al., 1988).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die PCR-Methodik der Virusisolierung in Bezug auf analytische Sensitivität überlegen ist (GIVENS et al., 2003b; STOKSTAD et al., 2003). Die Spezifität der „nested“ Realtime RT-PCR Methode wurde durch Sequenzierung und parallel durchgeführte VI bestätigt. Der Einsatz der Realtime RT-PCR ermöglicht überdies einen rascheren Nachweis von BVDV im Samen. Eine entsprechende Angleichung der EU Spermarichtlinie im Hinblick auf eine Erweiterung der BVDV-Untersuchungsmethoden mittels PCR wäre aus unserer Sicht dringend notwendig. Die höhere Sensitivität der PCR-Methodik in Verbindung mit einer kürzeren Probenbearbeitungszeit vermindert das Risiko der Verwendung BVDV kontaminierter Samenproben in der künstlichen Besamung (KB) und wäre somit ein wesentlicher Fortschritt in der Seuchenbekämpfung.

Nach der von VOGES et al. (1998) beschriebenen persistierenden BVDV Infektion des Genitaltraktes bei dem neuseeländischen Stier „Cumulus“ handelt es sich beim Stier „Gandi“ um einen weiteren persistierenden Virusausseider ohne gleichzeitige persistierende Virämie. Das Phänomen der persistierenden Genitalinfektion bei immunkompetenten Stieren konnte von GIVENS et al. (2003a) im Infektionsversuch reproduziert werden. So wurden 3 Stiere intranasal mit BVDV infiziert und über 7 Monate lang die Virusausscheidung im Samen mittels VI und PCR untersucht. Während mit der VI bei 2 Stieren bis zum 21. Tag post infectionem der BVDV-Nachweis gelang, konnte mittels PCR bei beiden Tieren 7 Monate BVDV im Samen nachgewiesen werden. Die PCR-Ergebnisse wurden durch immunhistochemische Untersuchung an einem Hodenbiopsat bestätigt. Bei einem der beiden Stiere gelang überdies die Anzüchtung des BVDV in der Zellkultur. Dass Viren über längere Zeiträume im Genitaltrakt persistieren und ausgeschieden werden können, ist auch von anderen Krankheitserregern bekannt. So kann das Equine Arteritis Virus, ein Arterivirus, jahrelang in den Hoden von Hengsten persistieren und über den Samen ausgeschieden werden (TIMONEY et al., 1986).

Über die tatsächliche Verbreitung und Bedeutung immunkompetenter, d.h. BVDV Antikörper-positiver Stiere mit persistierenden Genitalinfektionen liegen bisher keine Informationen vor, auch die Pathogenese ist noch nicht vollständig geklärt. Die postpubertäre Ausbildung der Bluthodenschranke und Abkopplung des Keimdrüsengewebes vom Immunsystem könnte eine Erklärung dafür sein, dass keine neutralisierenden Antikörper zur Viruseliminierung eindringen können (VOGES et al., 1998).

In der BVDV-Bekämpfung sollte gerade in Betrieben mit Natursprung beim Einsatz von BVDV-Antikörper-positiven Sprungstieren an eine mögliche Virusausscheidung über den Samen als Ursache für Fertilitätsprobleme im Bestand gedacht werden.

## Literatur

- BARLOW, R.M., NETTLETON, P.F., GARDINER, A.C., GREIG, A., CAMPBELL, J.R., BONN, J.M. (1986): Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. *Vet. Rec.* **118**, 321-324.
- BECHER, P., KÖNIG, M., THIEL, H.J. (2001): Bovine Virusdiarrhoe und Mucosal Disease: Molekularbiologie des Erregers, Pathogenese, Labordiagnostik und Bekämpfung. *Tierärztl. Prax. G.* **29**, 266-275.
- BIELANSKI, A., DUBUC, C., HARE, W.C.D. (1992): Failure to remove bovine diarrhoea virus (BVDV) from bull semen by swim up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization. *Reprod. Dom. Anim.* **27**, 303-306.
- BOLIN, C.A. (2000): Leptospirosis. In: OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4<sup>th</sup> ed., Paris, p. 265-275.
- BROWNLIE, J., MOENNIG, V. (2004): Strategies for BVDV control and the relevant use of vaccines. *Proc. 2<sup>nd</sup> Europ. Symp. on BVDV Control*, Porto, p. 32.
- DÜNSER, M., ALTMANN, M., SCHWEIGHARDT, H., LOITSCH A. (1999): Applicability of one tube RT-PCR for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in routine laboratory diagnosis. *Wien. Tierärztl. Mschr.* **86**, 357-366.
- EDWARDS, S., DREW, T., BROWNLIE, J. (2000): Bovine viral diarrhoea. In: OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4<sup>th</sup> ed., Paris, p. 843-854.
- FRAY, M.D., PATON, D.J., ALENIUS, S. (2000): The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Animal Reprod. Sc.* **60-61**, 615-627.
- GAEDE, W., REITING, R., SCHIRRMIEIER, H., DEPNER, K.R., BEER, M. (2005): Nachweis und Spezies-spezifische Differenzierung von Pestiviren mit der real-time RT-PCR. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **118**, 113-120.
- GIVENS, M.D., HEATH, A.M., BROCK, K.V., BRODERSEN, B.W., CARSON, R.L., STRINGFELLOW, D.A. (2003a): Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen after infection of negative, post-pubertal bulls. *Am. J. Vet. Res.* **64**, 428-434.
- GIVENS, M.D., HEATH, A.M., CARSON, R.L., BROCK, K.V., EDENS, M.S.D., WENZEL, J.G.W., STRINGFELLOW, D.A. (2003b): Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in semen samples from the South-eastern United States. *Vet. Microbiol.* **96**, 145-155.
- HOUE, H. (1999): Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* **64**, 135-144.
- HYNDMAN, L., VILCEK, S., CONNER, J., NETTLETON, P.F. (1998): A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted fetuses. *J. Virol. Methods* **71**, 69-76.
- KAHRS, R.F. (2001): *Viral diseases of cattle*. 2<sup>nd</sup> ed., Iowa State University Press, Ames, p. 113-126.
- KIRKLAND, P.D., MCGOWAN, M.R., MACKINTOSH, S.G., MOYLE, A. (1997): Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet. Rec.* **140**, 124-127.
- KIRKLAND, P.D., RICHARDS, S.G., ROTHWELL, J.T., STANLEY, D.F. (1991): Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* **128**, 587-590.
- KOMMISRUDE, E., VATN, T., LANG-REE, J.R., LØKEN, T. (1996): Bovine viral diarrhoea virus in semen from acutely infected bulls. *Acta Vet. Scand.* **37**, 41-47.
- LINDBERG, A.L.E., ALENIUS, S. (1999): Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.* **64**, 197-222.
- MAYR, A., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B., WITTMANN, G. (1977): *Virologische Arbeitsmethoden*, Band II, Serologie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 457-469.
- MEYLING, A., JENSEN, A.M. (1988): Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet. Microbiol.* **17**, 97-105.
- MILLS, J.H.L., LUGINBUHL, R.E. (1968): Distribution and persist-



- ence of mucosal disease virus in experimentally exposed calves. *Am. J. Vet. Res.* **29**, 1367-1375.
- MOENNIG, V., LIESS, B. (1995): Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **11**, 477-487.
- MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOE, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.V. MARTELLI, G.P., MAYO, M.A., SUMMERS, M.D. (1995): Report of the international committee on the taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* **140**, (Suppl. 10), 421-424.
- NISKANEN, R., ALENIUS, S., BELÁK, K., BAULE, C., BELÁK, S., VOGES, H., GUSTAFSSON, H. (2002): Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod. Dom. Anim.* **37**, 171-175.
- PATON, D.J., GOODEY, R., BROOKMAN, S., WOOD, L. (1989): Evaluation of the quality of and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Vet. Rec.* **124**, 63-64.
- PETERHANS, E., BACHOFEN, C., JUNGI, T.W., SCHWEIZER, M. (2004): BVD-Virus: wie man das Immunsystem weniger Tiere überlistet und damit in der Wirtspopulation weltweit erfolgreich ist. *Vet. Med. Austria/Wien. Tierärztl. Mschr.* **91**, 327-335.
- REVELL, S.G., CHASEY, D., DREW, T.W., EDWARDS, S. (1988): Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* **123**, 122-125.
- ROHDE, G., LIESS, B. (1970): Untersuchungen zur Pathogenese der Virusdiarrhoe-Mucosal-Disease des Rindes unter Verwendung einer heterotypischen Immunfluoreszenztechnik. *Zentralbl. Veterinärmed. B* **17**, 686-700.
- SANDVIK, T. (2004): Selection of diagnostic assays for BVDV control programmes. *Proc. 2<sup>nd</sup> Europ. Symp. on BVDV Control*, Porto, p. 12.
- STOKSTAD, M., NISKANEN, R., LINDBERG, A., THORÉN, P., BELÁK, S., ALENIUS, S., LØKEN, T. (2003): Experimental infection of cows with bovine viral diarrhoea virus in early pregnancy-findings in serum and foetal fluids. *J. Vet. Med. B* **50**, 424-429.
- TIMONEY, P.J., McCOLLUM, W.H., ROBERTS, A.W., MURPHY, T.W. (1986): Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res. Vet. Sci.* **41**, 279-280.
- VILCEK, S., HERRING, A.J., HERRING, J.A., NETTLETON, P.F., LOWINGS, J.P., PATON, D.J. (1994): Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* **136**, 309-323.
- VOGES, H., HORNER, G.W., ROWE, S., WELLENBERG, G.J. (1998): Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non viraemic bull. *Vet. Microbiol.* **61**, 165-175.
- WHITMORE, H.L., GUSTAFSSON, B.K., HAVARESHTI, P., DUCHATEAU, A.B., MATHER, E.C. (1978): Inoculation of bulls with bovine virus diarrhoea virus: Excretion of virus an effects on semen quality. *Theriogenology* **9**, 153-163.

## Rechtsnormen

1988

Richtlinie des Rates vom 14. Juni 1988 zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Anforderungen an den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Samen von Rindern und dessen Einfuhr (88/407/EWG).

2003

Richtlinie 2003/43/EG des Rates vom 26. Mai 2003 zur Änderung der Richtlinie 88/407/EWG zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Anforderungen an den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Samen von Rindern und an dessen Einfuhr.

## Anschrift der Verfasser:

Dr. Michael Dünser, Dipl. MTA Michaela Altmann, MR Dr. Hans Schweighardt, Kudlichstrasse 27, A-4021 Linz; Mag. Josef Dengg, Klessheim 32, 5071 Salzburg-Wals; Dr. Michaela Eichinger, Dr. Angelika Loitsch, Dr. Sandra Revilla-Fernández, Robert Koch Strasse 17, A-2340 Mödling.  
e-Mail: michael.duenser@ages.at