

Aus dem Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Zur Entero-Pathogenität boviner Coronaviren unter Feldbedingungen^{1,2}

Von K. MÖSTL, B. HINAIDY, CHR. LOIBL, H. SZEKELY,
E. HORVATH und F. BÜRKI

Adresse der Autoren: Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Universität,
Linke Bahngasse 11, A 1030 Wien

Mit 2 Abbildungen und 5 Tabellen

(Eingegangen am 25. Juli 1984)

Einleitung

Rotavirusinfektionen des Kalbes wurden 1969 (11), Coronavirusinfektionen 1973 (12) erstmalig beschrieben, beide als zuvor unbekannte Durchfallätiologien. Unter experimentellen Bedingungen ließen sich beide Erreger überzeugend als Ursache von Zottendenudation und Durchfällen erfassen. Da beide Virusarten sich nur schwierig *in vitro* züchten ließen und cytopathische Veränderungen lediglich mit bestimmten Virusstämmen zu beobachten waren, war die objektive Erfassung ihrer pathogenetischen Bedeutung unter Feldbedingungen jahrelang erschwert. Für Reihenuntersuchungen an größeren Tier- und umfangreichen Kotprobenzahlen fehlten zunächst die technischen Voraussetzungen im diagnostischen Untersuchungslabor.

Ein kommerziell erzeugter, gruppenreaktiver Rotavirus-ELISA ermöglichte alsdann Reihenuntersuchungen großen Stils und wurde von unserer Gruppe in längerfristigen Erhebungen mit hohem Informationswert eingesetzt. Parallel hierzu verwendeten wir zum routinemäßigen Coronavirusnachweis vorerst den HEHA-Test (21), wobei indessen die Frage nach seiner Spezifität angesichts unterschiedlichen Ausfalls von HEHA-Hemmtesten nicht überzeugend gelöst werden konnte. Das Viruslabor des Central Veterinary Institute in Lelystad setzte uns alsdann in die Lage, Kälberkotproben routinemäßig einem Coronavirus-ELISA zu unterwerfen, dessen Ergebnisse in dieser Arbeit schergewichtig behandelt werden³. Zusammenarbeit mit dem hiesigen Institut für Bakteriologie und Tierhygiene ermöglichte uns, selektionierte Kotproben zusätzlich auf enteropathogene *E. coli* zu testen.

Stichprobenweise wurden im Blutserum sowie dem Kolostrum von Mutterkühen sowie im Blutserum ihrer Kälber nach erfolgter Kolostrumresorption Antikörper gegen Rotavirus und Coronavirus bestimmt. Im Rahmen der Dissertation LOIBL (10) wurde außerdem geprüft, ob tägliche Zufütterung von Ersttagskolostrum bis zum 13. Lebenstag einen hemmenden Einfluß auf die Ausscheidung von Rotavirus bzw. Coronavirus habe bzw. die Häufigkeit von Durchfällen reduziere.

¹ Herrn Prof. Dr. Z. DINTER, Uppsala, zu seinem 70. Geburtstag gewidmet.

² Diese Untersuchungen wurden durch Mittel des Bundesministeriums für Gesundheit und Umweltschutz und der Hochschul-Jubiläumsstiftung der Stadt Wien gefördert.

³ Wir bedanken uns herzlich bei Dr. P. J. DE LEEUW für Instruktion, Ratschläge und Reagentien.

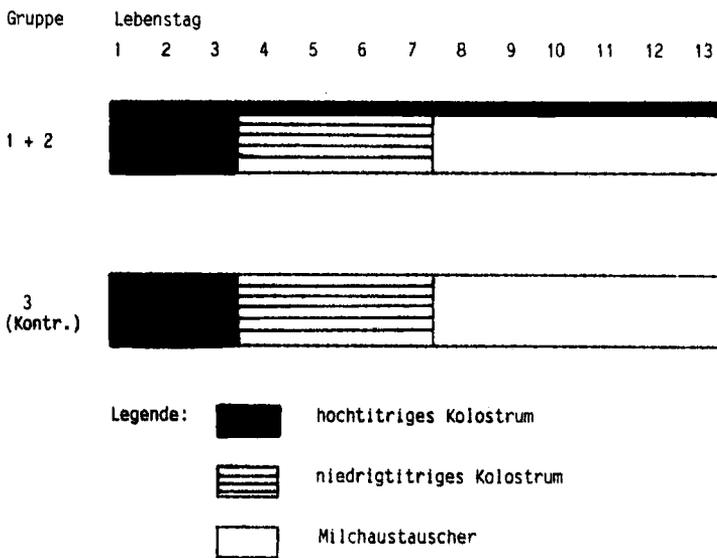


Abb. 1. Ernährungsplan der Kälber während der ersten 13 Lebenstage und mengenmäßige Zufuhr maternalen Antikörper

Die nach dieser Disposition erhaltenen Ergebnisse bestätigen die schlechte Korrelation zwischen Rotavirusausscheidung im Kälberkot und Durchfällen; sie ließen keinerlei Korrelation zwischen dem sporadischen Nachweis enteropathogener *E. coli* und Durchfällen erkennen; sie wiesen indessen eine sehr markante Korrelation zwischen Coronavirusausscheidung und dem Durchfallgeschehen der untersuchten Kälber aus. Als Nebenbefund wurde erhoben, daß die täglich einmalige Zufütterung von Ersttagskolostrum ungeimpfter Kühe nicht ausreichte, um Rotavirus- und Coronavirusausscheidung bzw. Durchfälle häufigkeitsmäßig zu reduzieren.

Derzeit laufenden Versuchen zufolge gelingt dies indessen durch Muttertierimpfung mit einem neu erschienenen Tripelimpfstoff, welcher Rotavirus, Coronavirus und *E. coli* enthält.

In dieser Arbeit werden schwergewichtig Häufigkeit und Schweregrad der Coronavirusinfekte bei Jungkälbern eines seit Jahren unter Kontrolle stehenden größeren Zuchtbestandes erörtert und die Gründe erläutert, weshalb Zufütterung von Ersttagskolostrum ungeimpfter Muttertiere ohne nachweisbaren Schutzeffekt verlief.

Material und Methoden

30 konsekutiv vom November bis März geborene Kälber des bekannterweise mit Rota-, Coronaviren und enteropathogenen *E. coli* verseuchten Zuchtbestandes (18) unseres Lehr- und Forschungsgutes wurden 3 Fütterungsgruppen gemäß Abbildung 1 zugeteilt. Ersttagskolostrum wurde entweder zu 200 ml portioniert tiefgefroren oder ad 1 % mit technisch reiner Zitronensäure MERCK versetzt und bei Zimmertemperatur gelagert. Den Kälbern der entsprechenden Versuchsgruppen wurde vom 4. bis 13. Lebenstag morgens nüchtern je eine Portion des auf 38°C vorgewärmten Ersttagskolostrums vorgefüttert. (Details siehe bei LOIBL [10]).

Rektalkot wurde bei jedem Versuchskalb täglich vom 4. bis 13. Lebenstag entnommen und dem Rotavirus-ELISA (Rotazyme® der Fa. Abbott) und Coronavirus-ELISA (selbes Verfahren wie in Lelystad für Rotavirus beschrieben [5]) unterworfen. Kotproben wurden in DYNATECH-Platten angesetzt und im Multiscan Flow abgelesen, der Grenzwert lag bei > 3fachem Wert der Hintergrundkontrolle und > 50 % Abblockung durch spezifisches Antiserum. Nur die Kotproben vom 4. und

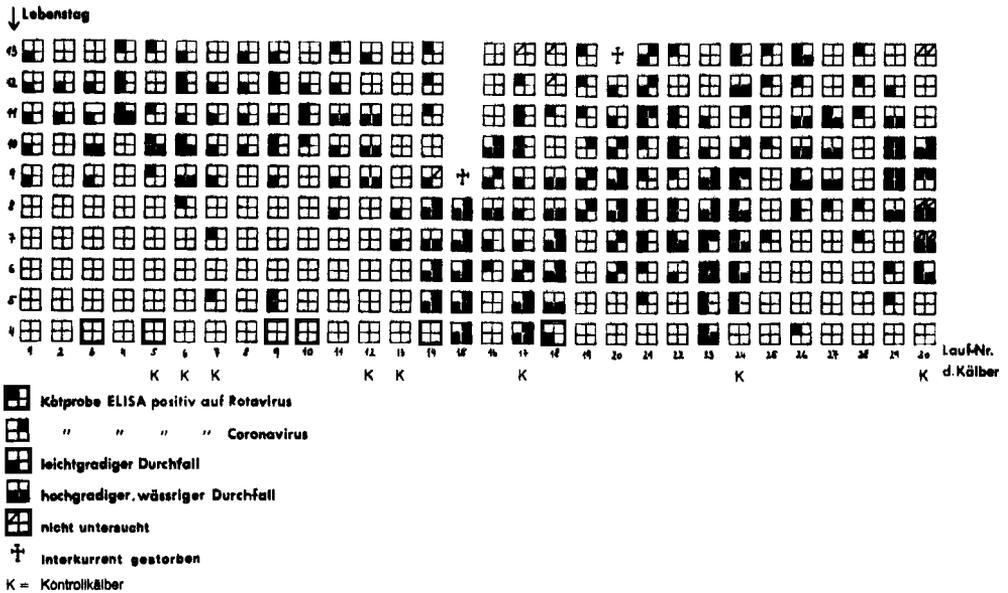


Abb. 2. Korrelation von Rotavirus- bzw. Coronavirus-Ausscheidung und Durchfällen bei 30 Kälbern vom 4. bis 13. Lebenstag

13. Lebenstag und vom ersten Durchfalltag wurden auf enteropathogene *E. coli* (1) untersucht⁴. Sogleich untersuchte Kotproben wurden bei + 4 °C gelagert, längere Lagerung erfolgte bei - 20 °C. Nach seinem Aussehen wurde der Kot als physiologisch bzw. dünnbreiig-schleimig oder wässrig beurteilt. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in der Abbildung 2 graphisch dargestellt.

Die Kälber wurden in Boxen einzeln oder zu zweien aufgestellt, welche durch Eternitzwischenwände relativ, aber nicht keimdicht voneinander abgegrenzt sind. Einmal pro Woche wurden die Boxen entmistet und mit 2 % NaOH desinfiziert, wobei die Kälber umgestallt wurden.

Erkrankte Kälber wurden wie andernorts im einzelnen beschrieben wurde (10) behandelt, wobei die 2mal tägliche Gabe von Glukose-Glycin-Elektrolytlösung (4) sehr wirksam gegen Dehydrierung eingesetzt wurde.

Als Gesundheitsparameter wurden täglich die Freßlust und Aufmerksamkeit registriert, bei Erkrankung die Temperatur gemessen. Alle Versuchskälber wurden am 4. und 14. Lebenstag gewogen.

Blutproben wurden am 4. bis 6. Tag nach der Geburt sowohl den Versuchskälbern wie ihren Müttern erstmalig, den Kälbern außerdem zwischen der dritten und fünften Lebenswoche entnommen. Die daraus erhaltenen Seren wurden auf Rotavirus-Antikörper in der KBR (3) sowie in einem Seroneutralisationstest auf der MA-104 Affenzelllinie untersucht, wobei der cytopathogene Stamm Compton⁵ verwendet wurde, ferner auf Coronavirus-Antikörper im HI-Test (15) geprüft. Als Antigen für den letzteren diente der Stamm L 9⁶, den wir auf Kälberthyreoidea-Zellen vermehrten.

Erstgemelk und eine am 10. Tag post partum entnommene Milchprobe jeder Kuh wurden zunächst 15 Minuten bei 200 g, alsdann für 2 Stunden bei 50 000 g abzentrifugiert, die erhaltenen Milchseren für 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert, alsdann bis zur Untersuchung bei - 20 °C gelagert.

Die Milchseren wurden mittels Seroneutralisationstestes auf Rotavirus-Antikörper, im HI-Test auf Coronavirus-Antikörper, nach LOWRY auf Gesamtprotein⁷, sowie in der Boskamp Mikrophorkammer auf Zelluloseacetat-Folien elektrophoretisch⁷ untersucht.

⁴ Durch Herrn Doz. Dr. AWAD-MASALMEH vom Institut für Bakteriologie und Tierhygiene (Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. H. WILLINGER), dem wir für diese Untersuchungen zu großem Dank verpflichtet sind.

⁵ Freundlicherweise von Dr. G. STUKER (damals Institut für Med. Mikrobiologie St. Gallen) erhalten.

⁶ Freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. h. c. R. RÖTT, Gießen, zur Verfügung gestellt.

⁷ Wir bedanken uns herzlich bei Prof. Dr. M. GEMEINER vom Institut für Med. Chemie (Vorstand: Prof. Dr. M. WEISER) für diese Untersuchungen.

Ergebnisse

Klinische Ergebnisse

Wie im selben Bestand in früheren Jahren (16, 17, 18) wurden die Kälber der vorliegenden Abkalbesaison in ihren ersten beiden Lebenswochen schwer von Durchfällen betroffen. (Das mit erhobene respiratorische und Fiebergeschehen, andernorts beschrieben [10], blieb bedeutungsmäßig weit zurück hinter dem Durchfallgeschehen.)

Von den 30 kontrollierten Kälbern entwickelten 28 (= 93 %) Durchfälle, 2 fielen trotz intensiver Behandlung durch Tod aus, wir gehen unten auf ihre Coronavirusätiologie näher ein. Insgesamt wurden 294 Kotproben klinisch beurteilt, wovon 126 (= 42,8 %) Durchfallkonsistenz zeigten.

Wie die Abbildung 2 ausweist, setzten während der ersten Hälfte der Beobachtung die Durchfälle überwiegend um den 10. Lebenstag ein, nur bei Einzelkälbern schon am 5., 7. bzw. 8. Tag. Vom 14. Versuchskalb an (genau koinzident mit dem Aufscheinen von Coronaviren, s. u.) sank das Erkrankungsalter auf den 4. bis 6. Lebenstag.

Wie die Abbildung 2 deutlich zeigt, dominierte bis zum 13. Kalb der leichtgradige breiig-schleimige Durchfall. Einzig für einen Tag nahm er bei 4 Kälbern, für 2 Tage bei einem Kalb wäßrige Konsistenz an. Dies änderte sich schlagartig vom 14. Kalb an (ab welchem positive Coronavirus-ELISA-Ergebnisse registriert wurden). Schwere wäßrige Durchfälle hielten (ungeachtet diätetischer und, falls erforderlich, antibiotischer Therapie) überwiegend 3—5 Tage lang an.

Die Durchfalldauer betrug im Schnitt, ungeachtet ob Ersttagskolostrum zugefüttert wurde oder nicht, 4,4 bis 4,7 Tage. Ein scheinbarer Nutzeffekt der Zufütterung manifestierte sich in höherer Gewichtszunahme von 6,75 kg zwischen 4. und 13. Lebenstag, gegenüber nur 4,9 kg Zunahme bei den Kontrollkälbern. Angesichts der großen Streubreite ließ sich indessen keine Signifikanz errechnen⁸.

Ausscheidung von Coronavirus gemäß ELISA

Von den tageweise gesammelten Kälberkotproben wurden 286 dem Coronavirus-ELISA unterworfen, hiervon fielen 37 (= 12,9 %) positiv aus. Aus der Abbildung 2 wird augenfällig, daß der ELISA auf Coronavirus von Kalb 1 bis 13 durchgehend negativ ausfiel. Diese Feststellung verdient in dreifacher Hinsicht Beachtung. Zum einen war dieser Großbestand (mit insgesamt 220 Rindern jeden Alters) schon in den beiden Vorjahren elektronenmikroskopisch abgesichert als mit Coronavirus verseucht ermittelt worden. Zum zweiten erfaßte Coronavirus in dieser Abkalbesaison, nachdem es einmal auf die Jungkälbergruppe übergegriffen hatte, von Kalb 14 an 12 der restlichen 17 kontrollierten Tiere, mithin 70,6 %. Drittens wurde oben bereits, unter den klinischen Ergebnissen, darauf hingewiesen, daß mit dem Zutreten der Coronavirusätiologie die Durchfälle früher auftraten, schwerer und länger waren und bei 2 Kälbern tödlich verliefen.

Der Todesfall von Kalb 15 betraf ein Tier, das 5 Tage zuvor kontinuierlich wäßrigen, Coronavirus-positiven, aber Rotavirus-negativen Kot aufgewiesen hatte (Abb. 2), am 4. Lebenstag waren stichprobenweise zusätzlich enteropathogene *E. coli* nachgewiesen worden (Tab. 5). Bei der Sektion wurden nicht näher charakterisierte *E. coli* in septikämischer Ausbreitung gefunden.

Der Todesfall von Kalb 20 betraf ein Tier, das kontinuierlich 5 Tage lang Coronavirus ausgeschieden hatte, niemals indessen Rotavirus (Abb. 2), am 4. und 6. Lebenstag auch keine enteropathogene Coli nachweisen ließ (Tab. 5). Die vom toten Kalb angelegten Bakterienkulturen wurden von Proteus vulgaris überwuchert.

Beachtung verdient die Tatsache, daß Kälber 15 und 20 als einzige wegen Agalactie ihrer Mütter überhaupt kein Kolostrum erhalten hatten, was offensichtlich die pathogene-

⁸ Wir danken Herrn Dr. Dipl. Ing. J. JAHN vom EDV-Zentrum, Institut für Med. Physik (Vorstand: Prof. Dr. G. KECK) für seine Berechnung.

Tabelle 1

Prozentuelle Verteilung, nach Lebenstagen gereiht, der mit Durchfall behafteten Kälber, in Relation zur Coronavirus-Ausscheidung im Kot (ELISA-Test)

	Durchfälle ⊕	ELISA ⊕	Durchfälle ⊖	ELISA ⊕	Durchfälle ⊖	ELISA ⊖
4. Lebenstag		6,7		0		6,7
5. Lebenstag		10,0		0		13,3
6. Lebenstag		20,0		0		10,0
7. Lebenstag		13,8		0		24,1
8. Lebenstag		17,2		0		34,4
9. Lebenstag		25,0		0		35,7
10. Lebenstag		17,2		3,4		48,3
11. Lebenstag		3,6		3,6		64,3
12. Lebenstag		3,6		0		50,0
13. Lebenstag		4,0		0		28,0
Prozentwerte insgesamt		121		7		315

tische Auswirkung ihrer Coronavirusinfektion erhöhte. Andererseits trat bei den 28 überlebenden Kälbern kein signifikanter Unterschied im Prozentsatz ihrer Coronavirus-Ausscheidung zutage, wenn sie zusätzlich zur maternalen Basisversorgung eine der beiden Zufütterungsarten von Ersttagskolostrum (Abb. 1) erhalten hatten.

Wie aus der Tabelle 3 zu entnehmen ist, waren am ersten Untersuchungstag, dem 4. Lebenstag, schon Rotavirusausscheider sowie Coronavirusausscheider zu ermitteln. Schwergewichtig betraf indessen die Coronavirusausscheidung eindeutig jüngere Kälber, indem sie meist um den 4. bis 9. Lebenstag einsetzte. Die diagnostizierte Ausscheidungsdauer lag mit 2—5 Tagen unter derjenigen der Rotaviren.

Was indessen sehr beeindruckt, ist die enge Korrelation der Coronavirusausscheidung zur Klinik (Tab. 1), sehr zum Unterschied zur Rotavirusausscheidung (Tab. 2).

In beiden Tabellen werden, tageweise prozentuell berechnet, die registrierten Durchfälle mit dem Ausfall des jeweiligen ELISA dargestellt. Addiert ergibt sich in der vordersten Kolonne ein zufällig praktisch identer Prozentsummenwert von Durchfällen, die mit positivem Rotavirus-ELISA bzw. Coronavirus-ELISA gekoppelt sind. Bei gleicher Berechnungsweise ergeben sich in der hintersten Kolonne in beiden Tabellen ebenfalls praktisch gleiche Prozentsummenwerte für ätiologisch ungeklärte Durchfälle.

Zum Unterschied davon unterscheiden sich die mittleren Kolonnen hochgradig, wo der Virusnachweis an klinisch normalen Kotproben berechnet wurde. Für Coronavirus-

Tabelle 2

Prozentuelle Verteilung, nach Lebenstagen gereiht, der mit Durchfall behafteten Kälber, in Relation zur Rotavirus-Ausscheidung im Kot (ELISA-Test)

	Durchfälle ⊕	ELISA ⊕	Durchfälle ⊖	ELISA ⊕	Durchfälle ⊖	ELISA ⊖
4. Lebenstag		3,3		3,3		10,0
5. Lebenstag		10,0		10,0		13,3
6. Lebenstag		10,0		10,0		20,0
7. Lebenstag		13,8		10,3		24,1
8. Lebenstag		13,8		10,3		37,9
9. Lebenstag		13,8		10,3		51,7
10. Lebenstag		20,7		10,3		44,8
11. Lebenstag		20,7		17,2		44,8
12. Lebenstag		14,3		17,9		39,3
13. Lebenstag		8,0		32,0		24,0
Prozentwerte insgesamt		128		131		309

Tabelle 3

Tageweise Aufschlüsselung in Prozenten nach Rotavirus-ELISA bzw. Coronavirus-ELISA von 30 Versuchskälbern

Lebenstage	Anzahl untersuchter Kälber	% Rotavirus positiv	% Coronavirus positiv
4	30	6,6	6,6
5	30	20,0	10,0
6	30	20,0	20,0
7	29	24,0	13,8
8	29	24,0	17,2
9	29	24,0	24,0
10	29	31,0	20,7
11	29	38,0	7,0
12	28	32,1	3,6
13	25	40,0	4,0

ELISA betraf dies einzig 2 Kälber, was den Prozentsummenwert von 7 ergibt (Tab. 1). Somit war fast ausnahmslos der Coronavirusnachweis mit Durchfall gekoppelt. Demgegenüber fiel prozentuell der Rotavirus-ELISA ebenso häufig an Normalkot positiv aus (Tab. 2).

Ausscheidung von Rotavirus gemäß ELISA

Im Vergleich zur Coronavirusausscheidung trat die Rotavirusausscheidung in zweifacher Hinsicht häufiger auf. Zum einen erfaßte sie mit 22 Kälbern (von 30, somit 73,3 %) mehr Tiere, außerdem fiel sie mit 25,6 % fast genau doppelt so oft positiv aus.

Wie der Tabelle 3 zu entnehmen ist, konnte fallweise die Rotavirusausscheidung so früh einsetzen wie die Coronavirusausscheidung, doch fiel der Rotavirus-ELISA schwergewichtig in die zweite Lebenswoche, wie wir in diesem Bestand schon früher beobachtet hatten (17).

Zufolge späten Beginns der Rotavirusausscheidung und am 13. Lebenstag beendeter Kontrolle konnte die Ausscheidungsdauer nur in begrenztem Ausmaß bestimmt werden. Sie dauerte indessen bei den Kälbern 21, 22, 24—26 länger als die des Coronavirus.

Auf die fehlende Korrelation zwischen Rotavirus-Nachweis und Durchfall (Tab. 2) wurde oben schon hingewiesen.

Saisonale Schwankungen der Rotavirus- und Coronavirusausscheidung

Sie sind aus den in der Tabelle 4 aufgeführten Kälberzahlen und Prozentwerten zu erkennen. Wie bereits früher in diesem Bestand (3, 17) lief die Rotavirusverseuchung auch in dieser Abkalbesaison in 2 Wellen ab. Auch die erstmalig überwachte Coronavirusausscheidung zeigte zwei durch ein Tal getrennte Wellenberge. Mit zunehmender Laufzeit des Versuches nahm der Prozentanteil viraler Doppelinfectionen zu (Tab. 4). Da indessen wegen geringerer anfallender Kälberzahl von der Doppel- zur Einzelaufstallung übergegangen werden konnte, setzte die Virusausscheidung im März einige Lebenstage später ein

Tabelle 4

Rota- und Coronavirusausscheidung (ELISA) an 30 Kälbern nach Kalendermonaten gereiht

Monat	untersuchte Anzahl Kotproben	Rotavirus - positiv		Coronavirus - positiv		hiervon Rota- und Coronavirus - positiv	
		Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%
November	75	13	17,3	0	0	0	0
Dezember	55	5	9,1	0	0	0	0
Januar	73	19	26,0	24	32,9	1	1,4
Februar	67	30	44,8	9	13,4	3	4,5
März	18	7	38,9	4	22,2	3	16,7

als im Januar, was wahrscheinlich die Begründung dafür abgibt, weshalb trotz Zweifachinfektion die schwere wäßrige Durchfallform nur kürzer auftrat als anlässlich der reinen Coronavirusinfektion im Januar (Abb. 2).

Ausscheidung enteropathogener E. coli

Enteropathogene *E. coli* wurden

- in 7 von 24 Kotproben vom 4. Lebenstag ermittelt, wobei 2mal Durchfall vorlag, 5mal Normalkot;
- in nur einer einzigen von 18 am ersten Durchfalltag entnommenen Kotprobe;
- in 5 von 22 am 13. Lebenstag entnommenen Kotproben, wovon eine Durchfallkonsistenz, 4 indessen physiologische Beschaffenheit aufwiesen.

Gesamthaft gewertet spielten somit enteropathogene *E. coli* eine völlig untergeordnete Rolle als mögliche Durchfallursache in diesem so häufig von Diarrhöen heimgesuchten Kälberbestand. Schon anlässlich der erstmaligen Rotavirusdiagnose vor 6 Jahren in diesem Bestand wurden Colibakterien als Akzidentellerreger eingestuft (18). In zwei systematisch kontrollierten seitherigen Abkalbesaisonen wurden auch niemals Coliseptikämien diagnostiziert (3, 17).

Serologische Ergebnisse

Die Blut- und Milchabnahme waren in diesem Versuch so disponiert worden, um im Falle eines Gelingens der Durchfallprophylaxe durch gruppenweise Zufütterung von konserviertem Ersttagskolostrum quantitative Aussagen machen zu können, welche Antikörpermengen hierfür erforderlich seien. Nun hat aber der gewählte Zufütterungsmodus keinen prophylaktischen Effekt erbracht. Unterschiedlich hierzu zeichnet sich im Einsatz

Tabelle 5

Nachweis enteropathogener *E. coli* aus Kotproben von 24 Kälbern

Tier / Gruppe	erste Kotprobe vom 4. Tag	Durchfallprobe am angegebenen Tag d	letzte Kotprobe vom 13. Tag
7 / K	+	+ 9. d	-
8 / Z	-	- 10. d	-
9 / Z	-	- 3. d	-
10 / Z	-	- 11. d	-
11 / Z	+	- 8. d	-
12 / K	-	- 9. d	-
13 / K	-	- 7. d	+
14 / TK	+	- 5. d	-
15 / TK	+	(4. d)	/
16 / TK	+	- 7. d	+
17 / K	+	(4. d)	-
18 / TK	-	(4. d)	-
19 / Z	-	- 8. d	+
20 / TK	-	- 6. d	/
21 / Z	-	- 7. d	-
22 / Z	+	- 6. d	-
23 / Z	-	(4. d)	-
24 / K	-	- 5. d	+
25 / TK	-	kein Durchfall	-
26 / TK	-	- 8. d	-
27 / TK	-	- 9. d	+
28 / TK	-	kein Durchfall	-
29 / Z	-	- 8. d	-
30 / K	-	- 6. d	-

Legende: + = enteropathogene *E. coli* nachgewiesen; - = enteropathogene *E. coli* nicht nachgewiesen; (4.d) = Durchfallprobe ident mit 1. Kotprobe; / = nicht untersucht weil interkurrent gestorben; TK = tiefgefrorenes Kolostrum zugefüttert; Z = Zitronensäure-Konserviertes Kolostrum zugefüttert; K = Kontrollkälber.

des in der Einleitung erwähnten Tripelimpfstoffes an den Mutterkühen ein markanter Nutzeffekt ab (E. SPIEGL, laufende Vet. Diss. Wien).

Für die vorliegende Arbeit wurden entsprechend sero-immunologische Untersuchungen auf Stichproben eingeeignet, die absichern sollten, daß die Basis zum potentiellen Passivschutz mittels Zufütterung von Ersttagskolostrum überhaupt gegeben war. Dies war tatsächlich der Fall, wie nachfolgende Werte belegen.

In den Ersttagskolostrum wurden üblicherweise Immunglobuline im Streubereich von 60—150 mg/ml gefunden. Neutralisierende Rotavirus-Antikörper lagen im Ersttagskolostrum im Bereich von 1 : 128 bis 1 : 512 vor und betrugen im Erstserum der Kälber 1 : 64 bis 1 : 128. Die HI-Titer gegen Coronavirus schwankten zwischen 1 : 256 und 1 : 4096 im Ersttagskolostrum und von 1 : 64 bis 1 : 256 im Erstserum der Kälber.

Diskussion

In Bestätigung früherer Erhebungen (3, 17, 18) traten in diesem großen Zuchtbestand Durchfälle bei Jungkälbern mit großer Häufigkeit auf. Wir registrierten sie, bei Anwendung wissenschaftlich schärferer Kriterien als seitens eines durchschnittlichen Tierbesitzers üblich, in den ersten beiden Lebenswochen bei 28 von 30 Kälbern der untersuchten Abkalbesaison. Ursächlich konnten überzeugend Coronaviren als Durchfallätiologie ermittelt werden, indem einerseits der Ausscheidungs-/Klinikoeffizient bei diesem Virus sehr hoch lag, andererseits die beiden einzigen Todesfälle Kälber betrafen, die ante exitum tagelang Coronavirus ausgeschieden hatten. Demgegenüber fehlte in dieser Untersuchungsserie die früher durch andere beschriebene enge (11) bzw. durch uns als zwar nicht eng aber überzeugend gedeutete Klinikrelation von Rotaviren (17, 18). Positiver Rotavirus-ELISA verteilte sich in dieser Serie rund hälftig auf Durchfallkot bzw. auf Normalkot. Auffallend war, wie selten der Nachweis enteropathogener *E. coli* von Durchfall begleitet war. Diese fehlende Klinikrelation entspricht den in Wien an diagnostischen Routineuntersuchungen von Kälberdurchfallproben gemachten Erfahrungen (H. WILLINGER, pers. Mittlg. 1984).

Am Durchfallgeschehen mögen teils andere ätiologische Erreger beteiligt gewesen sein, auf welche im Rahmen dieser Erhebung nicht untersucht wurde, teils war es höchstwahrscheinlich diätetisch bedingt, indem es kurz nach der landesweit üblichen abrupten Umstellung von Muttermilch auf Milchaustauscher (vgl. Abb. 1) auftrat. Dies wurde insbesondere in der ersten Hälfte der Beobachtungszeit augenfällig, wo Coronavirus niemals ausgeschieden wurde (Kälber 1 bis 13, Abb. 2).

Bovine Coronaviren führen beim Kalb zu zwei in der Literatur beschriebenen Krankheitssyndromen: einem enteralen beim Neugeborenen (12), einem respiratorischen bei rund halbjährigen Kälbern (14).

Da unsere hier erörterte Erhebung mit dem 14. Lebenstag der 30 ursprünglichen (bzw. 28 überlebenden) Kälber abschloß, beschränkt sich unsere Diskussion auf die enteropathogene Auswirkung dieses Virus. Wenngleich ihre Erstbeschreibung (12) über ein Jahrzehnt zurückliegt, finden sich nur wenige relevante Berichte über bovine Coronaviren in der Fachliteratur. Dies liegt in ihrer schweren Diagnostizierbarkeit begründet, solange kein Coronavirus-ELISA zur Verfügung stand. Da sich Feldstämme nicht mit cytopathischem Effekt oder überhaupt nicht *in vitro* kultivieren lassen (12), blieben Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz lange Zeit einzige Nachweisverfahren. Beide sind für einen routinemäßigen Einsatz ungeeignet, das erstere vom Aufwand her, das zweite ist schwierig zu interpretieren, sofern nicht ein absolut frischer Fall vorliegt oder die Darmschleimhaut direkt am Sektionsfall beurteilt werden kann (9, 12, 20).

Nach ursprünglich mittels Elektronenmikroskopie an Kälberkotproben des Bestandes gestellter Diagnose⁹ versetzten uns Kooperation und Reagentien Dr. P. W. DE LEEUW's

⁹ Wir sind den Herren Dres. M. SIBALIN und F. GERSTL von der Bundesstaatlichen Impfstoffgewinnungsanstalt (damaliger Leiter: Hofrat Dr. F. PÖTSCH) zu großem Dank verpflichtet für die Untersuchung.

aus Lelystad in die Lage, hunderte Kotproben mittels ELISA auf Coronavirusausscheidung zu untersuchen.

Die systematische Durchuntersuchung des beschriebenen Kälberkollektivs bestätigte einerseits Befunde von LANGPAP und Mitarbeiter (9), indem schwergewichtsmäßig die enteralen Coronavirusinfekte auf die erste Lebenswoche fielen. Sie steht damit im Widerspruch zur ursprünglichen Feststellung (20) und einer kürzlichen Beobachtung aus Belgien (22), denen zufolge Coronavirusinfekte auf die 2. und 3. Lebenswoche fielen. Früh einsetzende virale Schädigung impliziert folgerichtig frühes Einsetzen der Prophylaxe und, sofern diese passiv erfolgt, wohl auch frühzeitige Beendigung derselben (vgl. unten).

Weiters halten wir für bedeutsam, daß in unserer Erhebung eine engere Korrelation zwischen Coronavirusbefall und Durchfällen bestand, als bislang beschrieben wurde. An ihrem umfangreichen Untersuchungsgut wiesen LANGPAP und Mitarbeiter (9) lediglich bei 16,4 % ihrer Kälberdurchfälle Coronaviren nach. In unserem Bestand gelang dies vom Moment der Einschleppung an gerechnet bei 70,6 % der Kälber, und bis auf 2 Untersuchungstage lag bei diesen stets Durchfall vor, in überwiegend wässriger Form (Abb. 2).

Daß die beiden einzigen Todesfälle dieser Abkalbesaison (trotz intensiver Therapiebemühungen) 2 mit Coronavirus infizierte Kälber betrafen, ist als weiteres Kriterium für die Pathogenität dieses Virus zu werten. Weiters belegen Prozentzahlen von ätiologisch ausgerichteten Querschnitterhebungen an Sektionsfällen aus Belgien und Ungarn, daß auch anderswo bovine Coronaviren bzw. Corona-artige hohe Pathogenität aufweisen, sie machten dort 20 % (22) bzw. 24,7 % (13) aus.

Um die ökonomischen Schäden in diesem notorisch von enteralen Viren heimgesuchten Zuchtbestand einzudämmen, hatten wir seinerzeit erste aktive Prophylaxeversuche mit einem Peroral-Marktimpfstoff, welcher lebendes Rotavirus und Coronavirus enthält, durchgeführt (3). Wir führten sein Versagen auf ungenügenden Gehalt an Rotavirus (Coronavirus konnte damals nicht quantitiert werden) zurück, sowie auf Abneutralisation der Impfviren durch die in jedem Kolostrum vorhandenen Antikörper.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die passive Prophylaxe der laktogenen Immunität (7) durch Zufütterung von Ersttagskolostrum zu verlängern. Mangels eines geeigneten Impfstoffes zur Muttertierimpfung wurde hierzu Ersttagskolostrum ungeimpfter Kühe eingesetzt. Ungeachtet, ob in gefroren gelagerter oder säurekonservierter Form blieb dieses indessen wirklos. Aus diesem Grunde wird auf eine nähere Diskussion dieses Untersuchungsteils verzichtet. Bezüglich allgemeiner quantitativer Gesichtspunkte über den Immunglobulinstatus der Mutterkuh und ihres Kalbes wird auf KIM (8) verwiesen, bezüglich Säurekonservierung von Überschußkolostrum auf FOLEY und OTTERBY (6), bezüglich der passiven Immunprophylaxe gegen enterale Viren auf BACHMANN (2).

Ganz offensichtlich genügten die in den einmal täglich verabreichten 200 ml Ersttagskolostrum (limitiert durch Verfügbarkeit wie im Hinblick auf den Zeitaufwand des Besitzers) ungeimpfter Muttertiere enthaltenen Antikörper nicht, um eine angestrebte laktogene Immunität genügender Stärke zu induzieren. Hierfür sprechen indirekt von SNODGRASS und Mitarbeiter (19) publizierte Daten wie eigene Teilergebnisse aus seither vorgenommenen Muttertierimpfungen. Bei SNODGRASS und Mitarbeiter (19) vermochte in einem mit 4 bekannterweise enteropathogenen Erregern verseuchten Bestand Zufütterung 2mal täglich 200 ml Ersttagskolostrum die Kälberdurchfälle nachhaltig einzuschränken, sofern das Kolostrum von mit Rotavirus geimpften Kühen stammte, nicht aber von ungeimpften. Noch vielversprechender lauten die vorliegenden Teilergebnisse aus unserer laufenden Testserie am oben beschriebenen Lehr- und Forschungsgut. Wir verwendeten einen neu am Markt erschienenen Tripelimpfstoff zur zweimaligen Muttertierimpfung und fütterten deren Kälber während 14 Tagen (statt der bisherigen 7 Tage) ausschließlich mit Muttermilch. Der eindeutige klinische Nutzeffekt dieses Prophylaxeverfahrens korreliert nach bisherigen Erhebungsdaten gut mit reduzierter Rotavirusausscheidung wie mit erhöhten induzierten Antikörpertitern.

Abschließend zur hier beschriebenen Untersuchungsserie verdient einmal mehr hervorgehoben zu werden, welche wichtigen Faktoren bei Felduntersuchungen Jahreszeit und

Zeitspanne, die Aufstellungsart der Probanden und die getroffenen Desinfektionsmaßnahmen für die Ermittlung des Nutzeffektes eines Prophylaxeverfahrens darstellen.

Zusammenfassung

In einem bekannterweise mit Rotaviren, Coronaviren und enteropathogenen *E. coli* verseuchten Rinderbestand, in welchem Durchfälle neugeborener Kälber ein gravierendes Problem darstellen, wurden systematisch diese Erreger in Kotproben bestimmt und mit der beobachteten Klinik korreliert. In den ersten beiden Lebenswochen entwickelten 28 von 30 Kälbern einer Abkalbesaison Durchfälle (= 93 %). Von 294 beurteilten Kotproben wiesen 126 (= 42,8 %) Durchfallkonsistenz auf. Mittels täglich vorgenommenen Rotavirus-ELISA wurden doppelt so viele Kotproben (25,6 %) positiv befundet als mit Coronavirus-ELISA (12,9 %). Jedoch ergab sich nur für Coronavirus eine beweiskräftige Enteropathogenität, indem mit Ausnahme von 2 Tageskotproben sämtliche Coronavirus-ELISA positiven Kotproben mit Durchfällen korreliert waren. Auch setzten die Coronavirusausscheidungen früher ein und waren weit öfter von schweren wässrigen Durchfällen begleitet als die Rotavirusdurchfälle. Die beiden einzigen, trotz Therapie tödlich ausgehenden Durchfälle betrafen mit Coronavirus infizierte Kälber. Doppelinfekte mit Rotaviren waren zeitweilig nicht selten.

Die zahlreichen positiven Rotavirus-ELISA verteilten sich hälftig auf Normalkotproben wie Durchfallkotproben. Die Durchfälle waren, wie bereits früher in diesem Bestand ermittelt, häufiger in der zweiten als in der ersten Lebenswoche mit Rotavirus korreliert und zeigten häufig lediglich die gutartigere schleimig-breiige Form.

Die nachgewiesenen enteropathogenen *E. coli* zeigten nicht die geringste Korrelation zum Durchfallgeschehen.

Je 200 ml Ersttagskolostrum ungeimpfter Mutterkühe, in der gefährdeten Lebensphase vom 4. bis 13. Tag einmal täglich zugefüttert, verbesserte die passive laktogene Immunität dieser unter Feldbedingungen gehaltenen Kälber nicht.

Summary

On entero-pathogenicity of bovine coronavirus under field conditions

On a cattle-premises known to be infected by rotaviruses, coronaviruses and enteropathogenic *E. coli*, in which newborn calf scours formed a consistent serious problem, these infectious agents were systematically determined in faecal samples and the results correlated with clinical findings. Among 30 calves born during one calving season a total of 28 (= 93 %) developed scours during their first two weeks of life. Of 294 faecal specimens examined 126 (= 42.8 %) showed diarrhoeic consistency. Daily rotavirus-ELISA with 25.6 % positivity doubled the percentage of positive coronavirus-ELISA, which numbered 12.9 %. However, only for coronavirus was enteropathogenicity apparently always correlated with diarrhoea except for 2 one-day samples of faeces. Furthermore, shedding of coronaviruses started earlier in life and was much more frequently associated with severe watery diarrhoea than was rotavirus-associated diarrhoea. The only 2 calves of the series which succumbed in spite of severe treatment were infected with coronavirus. Double-infection with rotavirus was not infrequent in certain periods of time.

The frequently registered positive rotavirus-ELISA occurred with equal frequency in normal as well as in diarrhoeic faeces. Rotavirus-associated diarrhoea was more often encountered in the second week of life, corroborating an earlier enzootic pattern of this virus in this particular herd, and was often correlated with mild soft-mucous diarrhoea.

The enteropathogenic *E. coli* determined in the course of this investigation did not show the slightest correlation with diarrhoea.

A daily dose of first-day colostrum of unvaccinated mother cows, given from days 4 to 13, i.e. the most virus-endangered age phase, did not promote passive lactogenic immunity of these calves kept under field conditions.

Résumé

A propos de l'entéropathogénicité de Coronavirus bovin dans des conditions du terrain

Dans une exploitation bovine connue et infectée avec Rotavirus, Coronavirus et *E. coli* entéropathogène, dans laquelle des diarrhées des veaux nouveaux-nés étaient un grave problème, on a systématiquement déterminé ces agents dans les matières fécales et procédé à une corrélation avec la clinique observée. 28 des 30 veaux d'une saison de vêlages ont développé des diarrhées (= 93 %) dans les deux premières semaines de vie. 126 des 294 échantillons de fèces (= 42,8 %) présentèrent une consistance de diarrhée. Rotavirus-ELISA fait quotidiennement a montré le double d'échantillons de fèces positifs (25,6 %) par rapport à Coronavirus-ELISA (12,9 %). Une entéropathogénicité démontrée n'a été trouvée que pour Coronavirus, étant donné qu'à l'exception de 2 échantillons de fèces journaliers, tous les ELISA-Coronavirus positifs des matières fécales furent en corrélation avec des diarrhées. Les excréments de Coronavirus furent plus précoces et furent beaucoup plus souvent accompagnées de diarrhées que les cas de Rotavirus. Les deux seuls cas de diarrhée mortels malgré la thérapie ont atteint des veaux infectés avec Coronavirus. Des infections doubles avec Rotavirus furent temporairement pas rares.

Les nombreux Rotavirus-ELISA positifs ont été répartis pour moitié sur les échantillons de fèces normaux et de diarrhées. Les diarrhées constatées dans cette exploitation furent en corrélation avec Rotavirus plus souvent dans la deuxième que dans la première semaine de vie et présentèrent souvent uniquement la forme muqueuse et pâteuse bénigne.

Les *E. coli* entéropathogènes mis en évidence n'ont pas présenté la moindre corrélation avec la diarrhée.

200 ml de colostrum du premier jour des mères non vaccinées donnés quotidiennement une fois du 4^e au 13^e jour de la phase critique n'ont pas amélioré l'immunité lactogène passive dans ces conditions de terrain.

Resumen

Sobre la enteropatogenicidad de los virus corona bovinos bajo condiciones campales

En un efectivo vacuno, contaminado notorio por rotavirus, coronavirus y *E. coli* enteropatógenos, en el cual las diarreas de los terneros recién nacidos constituían un problema agravante, se verificaron sistemáticamente estos agentes etiológicos en muestras de estiércol, correlacionándose con la clínica observada. En las dos primeras semanas de vida desarrollaron diarrea 28 entre 30 terneros de una temporada de parto (= 93 %). De 294 muestras de heces analizadas mostraron 126 (= 42,8 %) consistencia diarreica. Mediante el ELISA rotavirus operado a diario se halló el número doble de muestras de estiércol (25,6 %) positivas que con el ELISA coronavirus (12,9 %). Sin embargo, solo para coronavirus se infirió una enteropatogenicidad concluyente, puesto que con excepción de 2 muestras diarias de estiércol todas las muestras de estiércol ELISA coronavirus positivas se hallaban correlacionadas con diarreas. También se iniciaron antes las eliminaciones de coronavirus y estaban acompañadas muchas más veces por diarreas acuosas graves que las diarreas por rotavirus. Las dos diarreas únicas con desenlace fatal, a pesar de ser sometidas a tratamiento, afectaban a terneros infectados con coronavirus. Limitadas a algún tiempo breve, no eran raras las infecciones dobles con rotavirus.

Los numerosos ELISA rotavirus positivos de distribuyen a medias en muestras normales y muestras diarreicas. Las diarreas estaban correlacionadas, como ya se comprobó antes en este efectivo, mucho más frecuentemente en la segunda semana que en la primera con rotavirus, mostrando muchas veces nada más la forma mucilaginoso-pultácea benigna.

Los *E. coli* enteropatógenos no mostraban la correlación más mínima para con el devenir de la diarrea.

El suplemento diario de cada vez 200 ml de calostro del día primero de vacas no vacunadas, de una asentada, en la fase en que corre peligro la vida desde el día 4^o hasta el

13°, no mejoró la inmunidad lactógena pasiva de estos terneros criados bajo condiciones campales.

Literaturverzeichnis

1. AWAD-MASALMEH, M., 1983: Nachweis von Enterotoxinen bei pathogenen *E. coli* des Ferkels. Wien. Tierärztl. Mschr. 70, 151—157.
2. BACHMANN, P. A., 1983: Muttertierschutzimpfung gegen lokale Infektionskrankheiten. Fortschr. Vet. Med. Heft 37. 15. Kongreßbericht, 40—54. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
3. BÜRKI, F., G. SCHUSSER, and H. SZEKELY, 1983: Clinical, virological and serological evaluation of the efficacy of peroral live rotavirus vaccination in calves kept under husbandry conditions. Zbl. Vet. Med. B 30, 237—250.
4. BYWATER, R. J., and G. N. WOODE, 1980: Oral fluid replacement by a glucose glycine electrolyte formulation in *E. coli* and rotavirus diarrhoea in pigs. Vet. Rec. 106, 75—78.
5. ELLENS, D. J., and P. W. DE LEEUW, 1977: Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. J. Clin. Microbiol. 6, 530—573.
6. FOLEY, J. A., and D. E. OTTERBY, 1978: Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrum: A review. J. Dairy Sci. 61, 1033—1060.
7. HAELTERMAN, E. O., 1972: On the pathogenesis of transmissible gastroenteritis of swine. J. Amer. Vet. Med. Ass. 4, 534—540.
8. KIM, J. W., 1981: Die Entwicklung des Immunglobulinstatus im Blutserum und seine Bedeutung für die Aufzuchtleistung von Kälbern in der Mutterkuhhaltung. Dissertation Universität Göttingen.
9. LANGPAP, T. J., M. E. BERGELAND, and D. E. REED, 1979: Coronaviral enteritis of young calves. Virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. Am. J. Vet. Res. 40, 1476—1478.
10. LOIBL, CHR., 1984: Auswirkungen der Zufütterung von Ersttagskolostrum an Kälber auf deren natürlich erworbene Infektion mit Rotaviren und Coronaviren. Dissertation Vet. Med. Universität Wien.
11. MEBUS, C. A., N. R. UNDERDAHL, M. B. RHODES, and M. J. TWIEHAUS, 1969: Calf diarrhea (scours): Reproduced with a virus from a field outbreak. University of Nebraska Res. Bull. No. 233.
12. MEBUS, C. A., E. L. STAIR, M. B. RHODES, and M. S. TWIEHAUS, 1973: Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation and characteristics of a coronavirus-like agent. Am. J. Vet. Res. 34, 145—150.
13. NAGY, B., 1983: Corona and corona-like viruses in diarrhoeal calves. 9th Congress Hung. Soc. Microbiol. 23.—25. 8.
14. REYNOLDS, D. J., L. H. THOMAS, J. C. BRIDGER, and E. J. STOTT, 1981: Coronavirus infections of cattle. 5th Internat. Congress of Virology, Strasbourg, Abstract P 16/21.
15. SATO, K., Y. INABA, H. KUROI, E. TAKAHASI, K. SATADO, T. OMORI, and M. MATUMOTO, 1977: Hemagglutination by calf diarrhea coronavirus. Vet. Microbiol. 2, 83—87.
16. SCHUSSER, G. F., 1982: Nachweis von Rotavirusantigen in Kotproben von Kälbern eines größeren Zuchtbestandes ohne Impfung bzw. nach peroraler Vakzination mit Lebendvakzine. Dissertation, Vet. Med. Universität Wien.
17. SCHUSSER, G., B. HINAIDY, and F. BÜRKI, 1982: A follow-up on bovine rotavirus dissemination among calves of a large dairy herd. Microbiol. 5, 321—332.
18. SIBALIN, M., H. SZEKELY und F. BÜRKI, 1980: Rotavirusinfektionen in einem größeren Rinderbestand. Wien. Tierärztl. Mschr. 67, 122—127.
19. SNODGRASS, D. R., J. STEWARD, J. TAYLOR, F. L. KRAUTIL, and M. L. SMITH, 1982: Diarrhoea in dairy calves reduced by feeding colostrum from cows vaccinated with rotavirus. Res. vet. Sci. 32, 70—73.
20. STAIR, E. L., M. B. RHODES, R. G. WHITE, and C. A. MEBUS, 1972: Neonatal calf diarrhea: Purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. Amer. J. Vet. Res. 33, 1147—1156.
21. VAN BALKEN, J. A. M., P. W. DE LEEUW, D. J. ELLENS, and P. J. STRAVER, 1978/1979: Detection of coronavirus in calf faeces with a haemadsorption-elution-haemagglutination assay (HEHA). Vet. Microbiol. 3, 205—211.
22. WELLEMANS, G., H. ANTOINE, Y. BOTTON et E. VAN OPTENBOSCH, 1977: La fréquence du virus Corona dans les troubles digestifs du jeune veau en Belgique. Ann. Méd. Vét. 121, 411—420.