

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Differenzierung von zytopathogenen und nichtzytopathogenen BVD-Virus-Stämmen im Gewebe des Verdauungstraktes von Rindern, bei denen experimentell Mucosal Disease erzeugt wurde, zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden Kryostatschnitte mittels der indirekten Immunperoxidase-Methode mit Hilfe monoklonaler Antikörper untersucht.

Die Untersuchung wurde am Gewebe von siebzehn Holstein Frisian Kälbern durchgeführt, von denen vierzehn demselben Bestand entstammten und mit einem identischen Virus persistierend virämisch waren. Drei BVD-Virus-negative Kälber wurden als Kontrolltiere in die Untersuchungen einbezogen.

Für die experimentelle Erzeugung von Mucosal Disease bei persistierend virämischen Rindern ist es erforderlich, daß eine Superinfektion mit einem zum vorhandenen nzp Stamm homologen zp Stamm erfolgt; diese Kombination aus nzp und homologem zp Stamm wird als "matching pair" bezeichnet. Aufgrund einer Analyse zytopathogener Stämme mit monoklonalen Antikörpern, wurden drei zp BVDV-Stämme, die zum Bestandsvirus nahezu homolog waren, für die Superinfektion ausgewählt.

Sechs Kälber wurden mit einem Gemisch der zp Stämme Indiana 1061, Lamspringe 735 und MD1 superinfiziert. Alle sechs Kälber erkrankten klinisch an akuter Mucosal Disease, die sich bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung durch eine hochgradige erosive bis ulzerative Stomatitis und eine katarrhalische bis diphtheroid-nekrotisierende Enteritis auszeichnete.

Die zur Superinfektion verwendeten zp Stämme unterschieden sich vom Bestandsvirus in ein bis zwei Epitopen des 53 KD Glykoproteins. Diese Unterschiede konnten im Gewebe durch den Einsatz von "Markerantikörpern" aufgezeigt und differenziert werden. Da in den Geweben der mit einem Gemisch aus drei zp Stämmen infizierten Kälber nur der zp Stamm Indiana nachgewiesen werden konnte, wurden drei weitere Kälber ausschließlich mit diesem Stamm superinfiziert. Auch diese Kälber erkrankten klinisch an akuter Mucosal Disease.

Der immunhistochemische Nachweis des zytopathogenen Stammes Indiana 1061 war in Gewebealterationen stets möglich. Ausgeprägte immunhistochemische Reaktionen wurden in den Erosionen der kutanen Schleimhaut beobachtet. Im Darm zeigten sich intensive Reaktionen in den basalen Bereichen der Darmkrypten. Hier waren zahlreiche Nekrosen zu sehen. Bei einem Kalb, welches ausschließlich intranasal superinfiziert wurde, reagierten hingegen bevorzugt die lumennahen Kryptbereiche. Die stärksten Epithelreaktionen wurden in der atrophischen Schleimhaut über den lymphatischen Einrichtungen des Darmes gesehen. Eine hochgra-

dige Reaktion der Markerantikörper wurde auch in den depletierten und nekrotischen Peyerschen Platten des Dünndarmes und in den lymphoglandulären Komplexen des Dickdarmes beobachtet. Die Reaktion in den Keimzentren der Follikel war am deutlichsten ausgeprägt. Zytopathogenes Virus wurde auch im follikelassoziierten Epithel nachgewiesen, sofern dieses nicht völlig nekrotisch war.

Vier weitere persistierend virämische Kälber wurden mit solchen BVD-Virusstämmen superinfiziert, durch die eine Auslösung von Mucosal Disease nicht zu erwarten war. Zwei dieser Kälber wurden mit einem heterologen zp Stamm, zwei weitere mit einem Gemisch aus drei homologen nzp Stämmen superinfiziert. Ein persistierend virämisches Kalb wurde nicht superinfiziert, um die Verteilung des Bestandsvirus im Gewebe ermitteln zu können. Keines dieser fünf Kälber erkrankte klinisch an Mucosal Disease. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung wurden nur geringgradige Veränderungen festgestellt. Die für die Superinfektion verwendeten BVDV-Stämme konnten im Gewebe nicht nachgewiesen werden. Im Gewebe persistierend virämischer Tiere konnte Antigen des Bestandsvirus nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. In Drüsen und in einzelnen Ganglienzellen wurde das Bestandsvirus jedoch durch eine intensive Reaktion dargestellt. In der Gruppe der an Mucosal Disease erkrankten Rinder war in den letztgenannten Lokalisationen zwar ein Nachweis von BVD-Virus möglich, jedoch reagierte dort keiner der Markerantikörper für zytopathogene Stämme. Dies ist möglicherweise auf Interferenzphänomene zwischen zytopathogenen und nichtzytopathogenen Stämmen zurückzuführen.

Waschbüsch J.:

Immunohistochemical differentiation between cytopathic and non-cytopathic BVD-virus strains in tissue from the intestinal tract of calves with experimental mucosal disease

## 6. Summary

The objective of this investigation was to develop a method for the differentiation between cytopathic (cp) and non-cytopathic (ncp) BVD-virus strains in tissue from the bovine intestinal tract. For this purpose cryostat sections were examined with the indirect immunoperoxidase method using monoclonal antibodies.

Seventeen Holstein Frisian calves were investigated. Fourteen originated from one herd and were found to be persistently infected with an identical BVD-virus strain. Three BVD-virus negative calves were used in this study as control.

To experimentally produce mucosal disease, superinfection of persistently infected cattle with a homologous cp strain of the BVD-virus is necessary. This combination of the ncp and a homologous cp strain is called a "matching pair". After analysing cp strains by means of monoclonal antibodies, the three almost but not totally homologous cp strains Indianal061, Lam-springe735 and MD1 were selected for experimental superinfection.

Six of the persistently infected calves were superinfected with these three cp BVD-virus strains and all of the animals developed the clinical signs of acute mucosal disease. At necropsy severe erosive and ulcerative lesions in the oral cavity and catarrhal to fibrinonecrotic enteritis were noted as most conspicuous alterations.

Since the cp virus strains used for superinfection had not been absolutely homologous to the herd-specific virus differences in one or two epitopes of the 53 KD glycoprotein were discovered. These epitopes were indicated and differentiated in the tissues by "marker-antibodies". In the tissue of the six calves, which were infected with the three cp BVD-virus strains only the cp strain Indiana was found. Thus three more calves were superinfected with this strain only. They, too, developed acute MD.

Immunohistochemical detection of the cp strain Indiana was always possible in severely affected tissues. Regions of the cutaneous mucosa with erosions were found to react intensively positive. In the intestinal tract immunohistochemical reactions of high intensity were seen in the depth of the epithelial crypts. In these localizations necrosis was frequent, as well.

In the tissue of one calf, which had been superinfected intranasally only, reaction was strongest in the luminal part of the crypts. The most intensive epithelial reactions were detected in the atrophic mucosa above the gut-associated lymphoid tissue. Distinct reactions of the "marker-antibodies" were observed in the depleted and necrotic Peyer's patches of the small intestine and in the lymphoglandular complexes of the large intestine. Especially the germinal centres of the follicles were intensively stained. Cytopathic virus was detected in the follicle associated epithelium, except in cases with total necrosis of this localization.

Additionally four persistently viraemic calves of the same source were superinfected with BVD-virus strains, which were not expected to produce MD in these animals. Two of these calves were superinfected with a heterologous cp strain, the two others with three homologous ncp strains. One persistently viraemic calf was not superinfected, so that the distribution of the herd-specific virus could be demonstrated in its tissues. None of these five calves developed clinical signs of mucosal disease. At necropsy only insignificant alterations were found and detection of the superinfecting BVD-virus strains was impossible.

In tissues of persistently viraemic animals the herd-specific virus was detected in some localizations of the intestinal epithelium and in intensively stained glands and scattered intramural ganglia. While in tissues of calves with mucosal disease those antibodies which are not able to distinguish between cp- and ncp strains showed strong reactions, there was no reaction with the cp strain "marker-antibodies" in the same localizations. This is probably due to interference phenomena between cytopathic and non-cytopathic BVD-virus strains.