

## 5. Zusammenfassung

Die *Mucosal Disease* (MD) des Rindes ist eine tödlich verlaufende Form der Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD-Virus), welches dem Genus Pestivirus innerhalb der Familie der Flaviviridae angehört. Die MD tritt nur bei Rindern auf, die persistent mit nichtzytopathogenem (nzp) BVD-Virus infiziert sind. Die Viruspersistenz resultiert aus einer pränatalen Infektion und geht mit einer spezifischen Immuntoleranz gegenüber der persistierenden Virusvariante einher. Während der Erkrankung an MD sind die Rinder zusätzlich mit einem zytopathogenen (zp) BVD-Virus infiziert. Dieses zp BVD-Virus wird für das Auftreten der MD-typischen Läsionen verantwortlich gemacht.

MD kann bei serologisch negativen, persistent infizierten Rindern durch Überinfektion mit zp BVD-Virus experimentell induziert werden. Einige Tiere erkrankten innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Überinfektion an "akuter" MD (MD-Frühausbruch); bei anderen Rindern treten MD-Erscheinungen erst nach mehreren Monaten auf ("*late-onset*" MD bzw. MD-Spätausbruch). Es wurde postuliert, daß MD-Frühausbrüche von antigenisch homologen zp BVD-Viren induziert werden, während antigenisch heterologe zp BVD-Viren MD nicht oder in Einzelfällen verzögert (MD-Spätausbrüche) induzieren können.

In dieser Arbeit werden BVD-Virusisolate und -stämme charakterisiert, die an zwei experimentell induzierten MD-Fällen beteiligt waren. Die Rinder waren mit dem gleichen nzp BVD-Virus persistent infiziert. Rind A wurde mit einer Mischung aus den zp Virusstämmen Indiana und MD1 und Rind B mit dem zp Virusstamm TGAC überinfiziert. Rind A erkrankte bereits zwei Wochen nach der Überinfektion an MD (Frühausbruch), während Rind B erst 14 Wochen nach der Überinfektion an MD erkrankte (Spätausbruch). Ziel der Arbeit war, durch die Charakterisierung der an beiden Fällen beteiligten BVD-Viren die Identität der zp BVD-Viren (zp-A und zp-B) zu klären, welche letztlich die MD-Ausbrüche verursacht hatten und während der Erkrankung isoliert worden waren.

Nach biologischer Klonierung wurde eine vergleichende Epitopanalyse der Viren mit 25 überwiegend gegen das Glykoprotein gp53 gerichteten monoklonalen Antikörpern (mAk) in Bindungs- und Neutralisationstests durchgeführt. Weiterhin wurden die an beiden Fällen beteiligten BVD-Viren mit Seren der Rinder A und B in Neutralisationstests charakterisiert. Zusätzlich wurden die Genome der Viren im Bereich des 5'-Endes des gp53-Gens und der für die überinfizierenden zp BVD-Viren charakteristischen genetischen Marker nach Amplifikation mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) sequenziert.

Im Fall von Tier A (MD-Frühausbruch) zeigte die vergleichende Epitopanalyse, daß der überinfizierende Virusstamm Indiana dem persistenten Virus antigenisch deutlich ähnlicher war, als es MD1 war. Das zp-A zeigte die gleiche Reaktivität wie der zp BVD-

Virusstamm Indiana. Diese Ergebnisse wurden durch die Sequenzanalyse der genetischen Marker und der Hälfte des gp53-Gens untermauert.

Die Epitopanalyse der Klone der an Fall B (MD-Spätausbruch) beteiligten Viren zeigte, daß das überinfizierende Virus TGAC aus zwei zp Subpopulationen bestand. Die Subpopulation TGAC-B1 war dem persistenten Virus antigenisch ähnlich, während sich die Subpopulation TGAC-B2 antigenisch deutlich vom persistenten Virus unterschied. Das während der Erkrankung isolierte Virus zp-B war antigenisch mit dem persistenten Virus identisch. Beide BVD-Viren zeigten die gleiche Reaktivität mit den mAk und wurden von dem Rekonvaleszentenserum im Gegensatz zu TGAC-B1 und TGAC-B2 nicht neutralisiert. Die Sequenzen aus dem gp53-Gen waren ebenfalls bei zp-B und dem persistenten Virus identisch. Nur eine der beiden TGAC-Subpopulationen (TGAC-B1) enthielt die für den Virusstamm TGAC charakteristische p80-Genduplikation. Dieser genetische Marker wurde ebenfalls in allen Klonen von zp-B gefunden.

Die Charakterisierung der an beiden Fällen beteiligten Viren zeigte, daß unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zur Induktion der MD geführt hatten. Im Fall des MD-Frühaustruchs induzierte das überinfizierende Virus Indiana unverändert direkt MD. Im Fall des MD-Spätaustruchs verhinderte die Immunabwehr des Rindes zunächst einen MD-Austruch. Erst nach einer Rekombination der Genome des persistenten Virus und des überinfizierenden Virus TGAC-B1 kam es zum MD-Austruch. Die Rekombinante konnte sich der Immunabwehr des Rindes entziehen und war gleichzeitig zur Induktion der MD fähig.

Beide Tiere wurden mit zwei zp BVD-Viren überinfiziert. In beiden Fällen war das im Vergleich zum persistenten Virus antigenisch ähnlichere überinfizierende BVD-Virus an der Induktion der Krankheitssymptome beteiligt. Eine enge antigene Verwandtschaft zwischen dem überinfizierenden und dem vom Immunsystem tolerierten nzp BVD-Virus scheint die MD-Induktion zu begünstigen. Eine sichere Vorhersage des Verlaufs eines experimentellen MD-Induktionsversuchs ist auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse jedoch nicht möglich.

Der Nachweis homologer Rekombinationen zwischen nzp BVD-Virus und zp BVD-Virus *in vivo* als pathogenetischer Mechanismus der MD-Induktion hat eine weitreichende praktische Bedeutung und kann zur Erklärung von im Feld beobachteten Phänomenen herangezogen werden. Persistent infizierte Rinder sind bei der Überinfektion mit zp BVD-Virus stets gefährdet, an MD zu erkranken. Dies trifft auch zu, wenn die Tiere nicht unmittelbar erkranken und das überinfizierende Virus vom Immunsystem scheinbar eliminiert wird. Dies ist bei dem Umgang mit Lebendvakzinen zu berücksichtigen, die zp BVD-Virus enthalten.

## Summary

Jörg Fritzscheier

### **Early-Onset and Late-Onset of Experimentally Induced Mucosal Disease: Characterization of the BVD-Viruses Involved**

Mucosal disease (MD) is a fatal disease of cattle caused by bovine viral diarrhoea virus (BVD-virus), a member of the *Pestivirus* genus within the family *Flaviviridae*. MD is only observed in cattle which are persistently infected with noncytopathogenic (ncp) BVD-virus. Virus persistence is the result of prenatal infection, and the persisting virus variant is specifically tolerated by the immune system. In cases of MD, cytopathogenic (cp) BVD-virus is isolated in addition to the persistent ncp virus. The cp BVD-virus is presumed to cause the lesions typical for MD.

MD can be induced experimentally in serologically negative, persistently infected cattle by superinfection with cp BVD-virus. Some cattle succumb within two to three weeks after superinfection to "acute"/early-onset MD; others show clinical symptoms several months after superinfection (late-onset MD). It has been postulated, that early-onset MD is induced by antigenical homologous cp BVD-virus strains/isolates, whereas antigenical heterologous cp BVD-virus either fail to induce MD or induce late-onset MD.

In this study the BVD-virus isolates and strains involved in two cases of experimentally induced MD are described. The two animals from the same herd were persistently infected with the same ncp BVD-virus isolate. Animal A was superinfected with a mixture of cp BVD-virus strains Indiana and MD1 and animal B with the cp BVD-virus strain TGAC. Animal A showed the first clinical symptoms of MD two weeks later (early-onset MD), while animal B developed severe diarrhoea fourteen weeks after superinfection (late-onset MD). The aim of this study was to characterize the cp BVD-viruses (cp-A and cp-B) isolated after the onset of clinical symptoms, and to unravel the identity of the cp BVD-viruses which had finally caused the disease.

After biological cloning of the viruses, comparative epitopic mapping was performed using 25 monoclonal antibodies (mabs) against the gp53 glycoprotein in binding and neutralizing assays. In addition, serum obtained from animals A and B was used for analysis of neutralizing activities against the viruses involved in each case. Genetic studies were performed by sequencing the 5' end of the gp53 glycoprotein gene and the genetic markers characteristic for the cp BVD-virus strains used for superinfection after their amplification using the polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR).

In the case of Animal A (early-onset MD) comparative epitopic mapping showed that the superinfecting virus strain Indiana was antigenically more similar to the persisting ncp BVD-virus than the second virus used for superinfection, strain MD1. They differed in the reactivity with 4 and 7 mabs, respectively. In addition, the reactivity pattern of the cp-A isolate was identical to the one of cp BVD-virus strain Indiana. These results were confirmed by sequence comparisons of the genetic markers and of the gp53 gene fragments.

Antigenic analyses of biological clones from the viruses involved in Animal B (late-onset MD) showed that the superinfecting virus strain TGAC consisted of two cp subpopulations. The reactivity pattern of subpopulation TGAC-B1 with the mabs was similar to that of the persistent virus, whereas subpopulation TGAC-B2 was antigenically clearly different. The cp BVD-virus cp-B isolated after onset of disease was antigenically identical to the persisting virus. Both viruses showed the same reactivity pattern with the mabs, and in contrast to the superinfecting cp BVD-viruses TGAC-B1 and -B2 they were not neutralized by a serum obtained after convalescence. The sequenced fragments of the gp53 gene of the cp-B and the persisting ncp BVD-virus were identical. Only one of the two TGAC subpopulations (TGAC-B1) contained the p80 gene duplication characteristic for strain TGAC. This genetic marker was also found in all clones from isolate cp-B.

The characterization of the viruses involved in the two cases led to the conclusion that induction of MD was caused by different pathogenic mechanisms. In the case of early-onset MD it is postulated that the lesions were induced directly by the superinfecting BVD-virus Indiana. In the case of late-onset MD it is conceivable that the animal was protected from MD by its immune defence until a viable recombinant between the genomes of TGAC-B1 and the persisting virus emerged. In the recombinant virus the ability to evade the immune defence and to cause MD were combined.

Both animals were superinfected with two cp BVD-viruses, respectively. In both cases, only the superinfecting viruses having more antigenic similarity to the persisting viruses having more antigenic similarity to the persisting ncp virus seemed to have been involved in the induction of MD. Nevertheless antigenic similarity alone does not seem to be enough to allow the prediction of the course of MD.

The evidence of a homologous recombination between ncp BVD-virus and cp BVD-virus *in vivo* as a pathogenic mechanism of induction of MD is of a far reaching practical importance and may help to interpret phenomena observed in the field. Persistently infected cattle are always at risk to succumb to MD when superinfected with cp BVD-virus. This has to be taken into consideration when handling with live vaccines which contain cp BVD-virus, as MD can be induced either directly after superinfection or delayed after recombinational events.