

## 6. Zusammenfassung

### Untersuchungen zur Pathogenese der Früh- und Spätform der Mucosal Disease

Mucosal Disease (MD) ist eine tödliche Durchfallerkrankung persistent infizierter Rinder, deren Erreger das Virus der Bovinen Virus Diarrhoe (BVDV) ist, ein Pestivirus der Familie *Flaviviridae*. Persistent infizierte Rinder entstehen als Folge einer intrauterinen Infektion mit dem nicht-zytopathogenen (nzp) Biotyp des BVDV. Von persistent infizierten Tieren wird nur der nzp Biotyp, von an MD erkrankten Tieren sowohl der nzp als auch der zp Biotyp des BVDV isoliert. Die MD läßt sich durch die experimentelle Überinfektion persistent infizierter Rinder mit antigen ähnlichem zp BVDV induzieren. Es wurde beobachtet, daß einige überinfizierte Rinder innerhalb von zwei bis drei Wochen erkrankten (Frühform der MD). Andere serokonvertierten und schienen das zp BVDV zu eliminieren. Einige davon zeigten jedoch Monate nach der Überinfektion Symptome der MD (Spätform der MD). Es wurde postuliert, daß der Fruhausbruch durch die Überinfektion mit antigen gleichem zp BVDV induziert werde, während die Überinfektion mit antigen unterschiedlichem zp BVDV zur Bildung neutralisierender Antikörper führte. In einigen dieser Fälle scheint das Virus nicht vollständig eliminiert zu werden, und sein Genom rekombiniert mit dem Genom des nzp BVDV zu einem neuen zp BVDV, das zur MD führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Verlauf nach der Überinfektion bis zum Ausbruch der MD untersucht. Zehn persistent infizierte Rinder wurden ausgesucht, deren nzp BVDV-Isolate die gleiche Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern (mAk) aufwiesen. Die zur Überinfektion verwendeten zp BVDV unterschieden sich vom nzp BVDV in ihrer Reaktivität mit zwei (Indiana), drei (MD-1), fünf (NADL) und sechs (IDA) von 19 mAk. Die verwendeten zp BVDV besaßen außerdem genetische Marker, die eine Identifizierung mittels Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription ermöglichten. Je zwei Tiere wurden intranasal mit je einem zp BVDV infiziert, zwei verblieben als Kontrollen. Ein weiteres Tier einer anderen Herde, das ebenfalls mit dem Virus Indiana überinfiziert worden war, wurde in die Untersuchungen einbezogen (Tier #11). Nach der Überinfektion wurden die Tiere ein Jahr lang beobachtet, und zunächst täglich, dann wöchentlich Blutproben zur virologischen und

serologischen Untersuchung entnommen. Die gewonnenen BVDV-Isolate wurden mittels Epitopenalyse und Sequenzierung charakterisiert.

Nach der Überinfektion konnten drei verschiedene Phasen unterschieden werden. In der ersten Phase entwickelten die Tiere #1 bis #8 leichte klinische Symptome. Das Tier #11 starb nach MD 14 Tage *post infectionem* (p.i.). Zp BVDV-Isolate wurden aus Leukozytenfraktionen aller Tiere innerhalb der ersten drei Wochen gewonnen. Die Untersuchungen zeigten, daß die Isolate eines jeden Tieres antigen und genetisch dem zur Überinfektion verwendeten zp BVDV entsprachen. Nach zehn bis 20 Tagen waren die klinischen Symptome abgeklungen und die überlebenden Tiere serokonvertierten (zweite Phase). Es bestand eine Korrelation zwischen den mittels mAk ermittelten Ähnlichkeiten zum nzp BVDV des Bestandes und des maximal erreichten Titers neutralisierender Antikörper. Keines der Tiere #1 bis #6 entwickelte MD innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Außerdem wurde im weiteren Verlauf kein zp BVDV mehr aus der Leukozytenfraktion isoliert. Nur zwei Tiere zeigten eine dritte Phase und erkrankten an MD. Sie waren mit dem zp BVDV IDA überinfiziert worden, das die geringste antigene Ähnlichkeit zum nzp BVDV der Herde besaß. Tier #7 starb an MD 42 Tage p.i. Genomanalysen ergaben, daß das nach Ausbruch der MD isolierte Virus eine Rekombinante zwischen dem überinfizierenden und dem nzp BVDV darstellte, obwohl antigene Unterschiede zum nzp BVDV-Isolat bestanden. Tier #8 erkrankte an MD fünf Tage später. Die innerhalb der ersten zehn Tage der Erkrankung isolierten zp BVDV waren mit dem entsprechenden zp BVDV des Tieres #7 identisch. Nach weiteren fünf Tagen waren neutralisierende Antikörper im Serum nachweisbar. Das am Tag der Euthanasie gewonnene Virusisolat enthielt ein weiteres zp BVDV, dessen Reaktivitätsspektrum mit mAk identisch mit dem des nzp BVDV war. Gegen diese Population wurden keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, daß die alleinige Auswahl von zp BVDV zur Überinfektion anhand des vergleichenden Reaktivitätsspektrum mit mAk keine gezielte Vorhersage zulaßt, ob ein persistent infiziertes Tier nach Überinfektion die Früh- oder Spätform der MD entwickelt, oder ob das überinfizierende Virus eliminiert wird.

## Summary

Bianca Löhner

### Pathogenic course of early and late onset Mucosal Disease

Mucosal Disease (MD) is a fatal disease of persistently infected cattle caused by bovine viral diarrhoea virus (BVDV), a member of the genus pestivirus within the family *Flaviviridae*. Persistently infected cattle arise as a consequence of a prenatal infection with the noncytopathic (ncp) biotype BVDV. While only ncp BVDV is isolated from p i animals, those with MD harbour both ncp and cp BVDV. Experimental MD can be induced in persistently infected cattle by superinfection with antigenically related cp BVDV strains. It was observed that while some cattle succumbed within 2-3 weeks after superinfection (early onset MD), others seroconverted and seemed to eliminate the virus. Some of these showed clinical symptoms several months after superinfection (late onset MD). It was postulated that early onset MD was induced by antigenically homologous cp BVDV strains, whereas antigenically differing strains lead to the induction of antibodies. In some of these cases the virus is not completely eliminated. There is evidence that recombinations between the ncp and cp BVDV genomes occur until a new viable cp BVDV emerges and leads to MD.

In the present study, the course between superinfection and outbreak of MD symptoms was studied. Ten cattle persistently infected with the same ncp BVDV isolate, as assessed by their reactivity with monoclonal antibodies (mabs), were selected. Comparative reactivity patterns of the cp BVDV strains (Indiana, MD-1, NADL and IDA) used for superinfection were performed with 19 mabs against the E2-glycoprotein. Their reactivity differed from the ncp BVDV isolate with 2 (Indiana), 3 (MD-1), 5 (NADL) and 6 (IDA) of 19 mabs, respectively. In addition, the cp BVDV strains possessed genetic markers detectable by polymerase chain reaction after reverse transcription. Each two animals were intranasally superinfected with one of the cp BVDV strains. The remaining two animals were left as controls. One animal from a different herd, which had also been superinfected with the cp BVDV strain Indiana, was included in the analysis (animal #11). After infection the animals were observed for one year and blood samples for virological and serological analysis were first taken daily and then every

week All BVDV isolates obtained after infection were characterized by epitopic mapping and by sequence analysis.

After superinfection three different phases could be distinguished. In the first phase the animals #1 to #8 developed slight clinical symptoms. Animal #11 developed MD 14 days *post infectionem* (p.i). Cp BVDV isolates were obtained from all animals within 3 weeks p.i. Antigenic and genetic analysis showed that the isolates from each animal were identical to the corresponding cp BVDV strains used for superinfection. After 10 to 20 days the clinical symptoms disappeared and the surviving animals seroconverted (2nd phase). There was a correlation between the antigenic homology as assessed with the comparative reactivity pattern with mabs and the titers of the neutralizing antibodies determined. None of the animals #1 to #6 developed MD within the observation period and cp BVDV was no longer isolated from buffy coat cells. Only two animals entered phase 3 and succumbed to late onset MD. These animals had been superinfected with the cp BVDV strain IDA which showed the least homology with the herd specific ncp BVDV isolate. Animal #7 succumbed to late onset MD on day 42 p.i. Genetic analysis showed that the BVDV isolates obtained after onset of disease were recombinants between the genomes of the superinfecting and the persisting BVDV, although the reactivity patterns with the mabs differed from that of the ncp BVDV. Animal #8 developed MD five days later. The cp BVDV isolates obtained between 1 and 10 days after onset of disease were antigenically identical to the corresponding isolate from animal #7. After five days neutralizing antibodies against this isolate were detected in the serum. The day the animal was euthanized an additional cp BVDV isolate was obtained, whose reactivity pattern was identical to that of the ncp BVDV isolate. No neutralizing antibodies against this virus were detectable.

These results show that antigenic homology between the cp and ncp BVDV as determined by the mabs alone does not allow to predict whether the animals will develop early or late onset MD or completely eliminate the virus.