

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch experimentelle Infektionen persistierend virämischer Kälber mit bestimmten zytopathogenen (zp) Stämmen des Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV) wurden zwei unterschiedliche Formen der Mucosal Disease (MD) erzeugt. Nach Superinfektion mit einem homologen Virusstamm erkrankten nahezu alle Rinder innerhalb von etwa zwei Wochen an der Frühform (early onset) der MD. Tiere, die mit einem weniger homologen Virusstamm infiziert wurden, reagierten mit einer Serokonversion. Erst nach mehreren Wochen bis Monaten kam es zum Ausbruch von akuter MD. Diese Form wird Spatform (late onset) der MD genannt. Ziel dieser Arbeit war es, morphologische Unterschiede zwischen diesen beiden Formen der akuten MD herauszustellen.

Es wurden Organproben von acht Tieren mit der Frühform (Gruppe III) und fünf Tieren mit der Spatform (Gruppe IV) vergleichend untersucht. Alle Tiere wurden im moribunden Krankheitsstadium der MD euthanasiert und sezziert. Als Kontrollgruppen dienten zwei BVDV-freie (Gruppe I) und drei klinisch gesunde, persistierend virämische Tiere (Gruppe II).

Die Organproben wurden zunächst histologisch anhand von formalinfixierten Paraffinschnitten und immunhistologisch anhand von Gefrierschnitten untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die bei Voruntersuchungen beobachteten Gefäßwandalterationen gelegt.

Die Befunde bei der Frühform der MD bezüglich Morphologie und Antigenverteilung entsprachen weitgehend denen der Literaturangaben. Bei den Spatform-Tieren korrelierte das Ausmaß der herdformigen Darmschleimhautschäden mit dem immunhistologischen Nachweis des BVDV-Antigens. Im Gegensatz dazu zeigten die für MD charakteristischen morphologischen Läsionen bei Tieren mit der MD-Fruhform ein großflächigeres, gleichmäßiges, diffuses Verteilungsbild.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Tieren der Gruppe III und IV zeigte sich bei der strukturellen Untersuchung der Peyerschen Platten des Dünndarmes. Während bei den Tieren der Gruppe III die Follikel strukturell gut erhalten, aber sehr zellarm erschienen, war die Follikelstruktur bei den Tieren der Gruppe IV aufgehoben. Als Überreste der Peyerschen Platten existierte nur noch ein schmaler Zellsaum unterhalb der Lamina muscularis mucosae. Immunhistologisch konnten die verbliebenen Zellen überwiegend als CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten identifiziert werden.

Ausgeprägte Gefäßwandveränderungen wurden bei drei Tieren der Gruppe III nur im Rektum und bei allen fünf Tieren der Gruppe IV in der Submukosa mehrerer Lokalisationen von Dünn- und Dickdarm festgestellt.

Die Gefäßläsionen konnten mit Hilfe von Serienschritten als noduläre hyaline bis fibrinoide Gefäßwandnekrosen mit assoziierten hochgradigen, perivaskulären Infiltraten charakterisiert werden. Es waren vorrangig Arteriolen und kleine Arterien betroffen.

Durch immunhistologische Untersuchungen mittels monoklonaler Antikörper konnten die mononukleären Infiltratzellen im medianahen Bereich als Makrophagen, die weiter peripher gelegenen als CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten identifiziert werden. Beide Schichten wurden diffus von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten durchsetzt. Nur selten stellten sich sektorförmige Areale innerhalb der Infiltrate dar, die auch B-Lymphozyten enthielten. In den veränderten Arealen der Gefäßwand konnte immunhistologisch regelmäßig IgG2 und IgM nachgewiesen werden. Ablagerungen von Komplement C3c, sowie von sich granular darstellendem BVDV-Antigen konnten nur vereinzelt in Gefäßläsionen der Tiere der Gruppe IV nachgewiesen werden.

Die ultrastrukturelle Untersuchung der alterierten Gefäße wurde exemplarisch an glutaraldehydfixierten, in Epon eingebetteten Gewebeprobe von zwei Tieren der Gruppe IV durchgeführt. In alterierten Gefäßwandarealen konnten Ablagerungen von Plasma und von Fibrin in unterschiedlichen Polymerisationsgraden, teilweise mit der charakteristischen Periodizität von stabilem Fibrin, nachgewiesen werden.

Elektronenmikroskopisch wurden in Endothel- und Mediazellen degenerative Veränderungen beobachtet, wie sie bei BVDV-Infektionen auch in anderen Geweben vorkommen. Dabei handelte es sich um hochgradige Dilatation des rauen endoplasmatischen Retikulums und Karyopyknose. Trotz des immunhistologischen Nachweises des zp BVDV in einzelnen Gefäßwänden konnten ultrastrukturell keine BVDV-Partikel dargestellt werden.

Die Ablagerungen von Fibrin, Immunglobulinen und geringer Mengen von Komplement lassen das Vorliegen einer erhöhten Gefäßpermeabilität vermuten.

Große morphologische Ähnlichkeiten mit den Vaskulitiden des Bosartigen Katarrhalfiebers des Rindes und der Border Disease der Schafe deuten auf Gemeinsamkeiten in der Genese der für die MD-Spatform beschriebenen Gefäßläsionen hin.

## 6 SUMMARY

Anke Lanwehr (1998)

### **Comparative histological, immunohistological and transmission electron microscopic investigations of cattle with experimentally induced early onset and late onset mucosal disease**

Experimental infections of persistently viremic calves with defined cytopathogenic (cp) strains of Bovine Virus Diarrhea Virus (BVDV) resulted in two different forms of mucosal disease (MD). Calves superinfected with homologous viral strains succumbed to acute early onset of MD within about two weeks. Animals which received a less homologous strain, seroconverted and succumbed to acute MD several weeks or months after superinfection. This type of MD has been termed late onset type. The main focus of this thesis was to elaborate differences between these two types of MD.

Organ tissues of eight cattle with early onset MD (group III) and five cattle with late onset of MD (group IV) were investigated. All animals were euthanized and necropsied after they had developed acute MD and became moribund. For comparison, tissues from two BVDV-free cattle (group I) and from three persistently viremic, clinically healthy cattle (group II) were investigated.

Formalin-fixed, paraplast-embedded organ tissues were investigated histologically and immunohistological methods were applied to cryostat sections. Points of main effort were set on vessel lesions, which were seen from pilot investigations.

The morphological and immunohistological findings in early onset of MD corresponded to the data given in the literature. In cattle with late onset of MD the degree of multifocal mucosal alterations in the intestine correlated with the distribution of cp BVDV antigen demonstrated by immunohistology. In contrast the lesions and antigen distribution in early onset MD were spread diffusely over the whole mucosal surface.

A further difference between animals of group III and IV became evident by comparison of Peyer's patches (PP) of small intestine. While the follicles in cattle with early onset of MD were structurally well preserved but with low cell density, the follicle structure of cattle with late onset MD was completely destroyed. Remnants of PP consists of a thin cell layer below the Lamina muscularis mucosae. By use of immunohistological methods the remaining cells were shown to be predominantly CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells.

Unusual vessel alterations were detected in three animals of group III in the rectum only and in all five animals of group IV in the submucosa of several localisations of small and large intestine

These lesions were closer characterised by serial sections as nodular hyaline to fibrinoid necrosis of the vascular wall with associated perivascular infiltration. Especially arterioles or small arteries were affected

By use of monoclonal antibodies the mononuclear cells adjacent to the media were identified as macrophages, and the cells in the outer circumference as CD4<sup>+</sup> T-cells. Both layers were infiltrated diffusely by CD8<sup>+</sup> T-cells. In limited areas of single perivascular infiltrates a small number of B-cells were present

In altered regions of necrotic vascular walls IgG2 and IgM were detected by immunohistological methods. Deposits of complement C3c and granular BVDV-Antigen were present in a few vascular lesions in cattle of group IV only

For ultrastructural investigations of vascular lesions, tissues of two animals were fixed in glutaraldehyde and embedded in epon. In altered regions of necrotic vessel walls plasmatic and fibrinoid deposits of different degrees of polymerisation, partly with characteristic periodicity of stable fibrin were found

Degenerative lesions in cells of endothelial layer and media were very similar to those described in other tissues due to BVDV infection. They were characterised by severe dilatation of rough endoplasmatic reticulum and karyopycnosis

Despite the immunohistological demonstration of cp BVDV antigen within single vascular walls, no virus particles were found ultrastructurally

The deposits of fibrin, immunoglobulins and small amounts of complement suggest that an increase of vascular permeability may have initiated the vascular destruction

The morphologic similarities to vasculopathies as seen in malignant catarrhal fever of cattle and known to occur in sheep with border disease would imply that comparable pathogenetic mechanisms may be involved