

## 6 Summary

Pathogenesis of Classical Swine Fever (CSF) has mainly been studied in experiments conducted with CSF virus strains which are used in the laboratories as diagnostic tools e.g. CSF virus strain *Brescia*. However these reference strains which are phylogenetically grouped into the subtype 1 have not been found in the field during the last decade. The main objective of the present work was to study pathogenicity of CSF in domestic pigs infected with recent field isolates from Germany. The CSF field isolates *Visbek/Han 95* and *Losten/Freese 98* were used for experimental infection. Both viruses were isolated in Germany during the mid-nineties and were grouped into the subtypes 2.3 *Visbek* and 2.3 *Guestrow* respectively. Since they do not belong to the same subtype as the above mentioned reference strains, it can be questioned if the pathogenesis or the outcome of the disease differs, if different strains or isolates are involved. Hence the purpose of this work was:

- a) to study the above mentioned CSF virus field isolates in particular their effect on clinical course and the changes within the Peripheral Blood Leukocytes (PBL)
- b) to study the target cells of CSF virus in PBL and
- c) to assess flow cytometer as a diagnostic tool by comparing the method with the conventional virus isolation.

Two experiments were conducted. In experiment 1 eight weaned pigs were inoculated intranasally with CSF virus field isolate *Visbek/Han 95* while in experiment 2 three weaned pigs received CSF virus isolate *Losten/Freese 98*. After inoculation, blood samples for virus isolation, flow cytometry and antibody detection were collected regularly. The changes within the leukocyte subpopulations as well as the CSF virus antigen therein was examined by flow cytometry.

Both CSF virus field isolates were characterized as being virulent in weaner pigs. All pigs developed the acute form of CSF and died within 9 to 24 days post infection. Leukopenia due to the depletion of T and B lymphocytes, thrombocytes, monocytes and granulocytes was seen in all pigs of both experiments. Proportionally granulocytes and monocytes appeared to dominate after infection in the PBL while the proportion of

lymphocytes decreased. Within the population of T lymphocytes a decrease in the relative number of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T lymphocytes and CD6<sup>+</sup> T lymphocytes was noticed. The latter was first described in this study. Thrombocytopenia was observed on 7 dpi and thrombocytes progressively decreased until the pigs died or were euthanized. The drop of thrombocytes at a level near  $\pm 100$  G/L was the mark for the emergence of petechial hemorrhages for the pigs of this study.

Most characteristic was the appearance of low density granulocytes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) preparation after infection. They were found in peripheral blood before virus could be isolated. The early appearance of low density granulocytes combined with the depletion of B lymphocytes would allow a tentative diagnosis. Low density granulocytes were also most probably the first cells in the peripheral blood infected with CSF virus. In addition, they contained a high percentage of virus at early stage of CSF. Therefore, PBMC obtained from Ficoll-Hypaque preparation should be the sample of choice for CSF virus isolation.

In respect to clinical outcomes, kinetics of leukocytes and target cells in PBL, similar results have been reported from pigs infected with CSF virus strain *Alfort* and *Brescia*. It indicates that the grouping of isolates and strains so far by phylogenetic analyses has no relevance on the virulence of CSF virus.

Flow cytometry can be used as diagnostic tools for CSF. However its sensitivity is below that of virus isolation. In addition, it is not a fully automated tool, it needs special care and it is relative expensive. The advantage of using flow cytometry in CSF diagnosis is the short time of 2-3 hours from receiving the sample until delivering the result.



Alle Absatzferkel starben spätestens in der vierten Infektionswoche an den Folgen der akuten Form der KSP-Virusinfektion.

Anhand dieser klinischen Daten können beide Feldisolate als virulent für Absatzferkel eingestuft werden. Insgesamt war der Krankheitsverlauf ähnlich wie bei Infektionen mit KSP-Viren des Subtyps 1.

KSP-Virus konnte bei allen Schweinen zum ersten Mal am 7. Tag nach der Inokulation sowie während der gesamten Krankheitsphase aus der Leukozytenfraktion isoliert werden. In der Terminalphase der Erkrankung wurden bei vier Schweinen des ersten Versuches und bei einem Tier aus dem zweiten Versuch niedrige Titer neutralisierender KSP-Antikörper gemessen.

Bei allen Absatzferkeln konnte eine Leukopenie bedingt durch die Abnahme von B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten festgestellt werden. Verhältnismäßig dominierten nach der Inokulation die Granulozyten und die Monozyten das weiße Blutbild, wobei die Lymphozyten im Verhältnis abnahmen. Innerhalb der Population der T-Lymphozyten nahmen die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> und CD6<sup>+</sup>T-Lymphozyten ab. Die Depletion der CD6<sup>+</sup>T-Lymphozyten wurde erstmalig in dieser Arbeit beschrieben.

Charakteristisch war das Auftreten von Granulozyten geringerer Dichte (*low density granulocytes*) innerhalb der mononukleären Zellen im Blut. Sie wurden, noch bevor KSP-Virus aus dem Blut isoliert werden konnte, nachgewiesen. Diese Granulozyten waren auch die ersten Zellen, bei denen KSP-Virusantigen zu einem hohen Prozentsatz nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grunde sollten Aufarbeitungen mononukleärer Blutzellen bevorzugt zur KSP-Virusisolierung genommen werden. Zusätzlich erlaubt das frühe Auftreten dieser Granulozytenpopulation zusammen mit der B-Lymphozytendepletion eine KSP-Verdachtsdiagnose zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion.

Bezüglich des klinischen Krankheitsverlaufes, der Veränderungen im weißen Blutbild sowie der Zielzellen im Blut wurden mit den Feldisolaten *Visbek/Han 95* und *Lossen/Freese 98* ähnliche Ergebnisse erzielt wie mit den KSP-Viren des Subtyps 1, zum Beispiel den KSP-Viren *Alfort* oder *Brescia*. Dies läßt schließen, daß die Gruppierung anhand von Genomsequenzen keine relevante Aussage bezüglich des Krankheitsverlaufes, der Erregervirulenz oder sogar der Pathogenese der KSP erlaubt.

Die Durchflußzytometrie kann in der KSP-Diagnostik begrenzt eingesetzt werden. Die Sensitivität dieser Methode liegt unterhalb der Sensitivität der zellkulturellen Virusisolierung. Das Verfahren ist zur Zeit nicht völlig automatisierbar, so daß unter Routinebedingungen, verglichen mit entsprechenden ELISA-Nachweissystemen, eine hohe Zahl an Proben nicht untersucht werden kann. Die Durchflußzytometrie hat allerdings den großen Vorteil der Schnelligkeit, denn ein Ergebnis kann innerhalb von 2 bis 3 Stunden nach dem Eintreffen der Blutprobe erhalten werden.