

## 5. Diskussion

### 5.1. Tierexperimentelle Studien

Wie bereits in der Literaturübersicht beschrieben, variiert das Bild der KSP innerhalb eines weiten Spektrums von perakuten bis hin zu klinisch inapparenten Verläufen. Einen starken Einfluss auf den Grad der Krankheitsausprägung nehmen dabei neben der Virulenz und weiteren virusseitigen Faktoren auch die Eigenschaften des Wirtes.

Die hier dargestellten Tierexperimente wurden mit dem Ziel durchgeführt, die ausgewählten Feldisolate hinsichtlich ihrer pathogenen Eigenschaften für Haus- und Wildschweine zu charakterisieren. Weiterhin sollte ermittelt werden, inwieweit durch unterschiedliche Wirtsfaktoren bei den beiden Schweinearten differente Krankheitsbilder generiert werden.

#### 5.1.1. Infektion mit dem KSPV-Feldisolat 95/1279

Die Infektion mit Isolat 95/1279 führte bei Haus- und Wildschweinen zu einem unterschiedlichen Verlauf. Während alle Hausschweine subakut erkrankten und 3 bis 4 Wochen *p.i.* verendeten, überlebten die Wildschweine bis zum Ende des Experiments am 61. *d p.i.* Die Hausschweine entwickelten ab dem 5. *d p.i.* das klinische Bild der akuten KSP. Körpertemperaturen von über 41°C und Maximalwerte der klinischen Indices, die mit 12 bis 17 mehr als die Hälfte der insgesamt möglichen 21 Punkte erreichten, sprachen für eine Einstufung des Virus als hochvirulent (Mittelholzer *et al.*, 2000). Demgegenüber zeigten die Wildschweine im Wesentlichen unspezifische Symptome. Körpertemperatur und klinische Indices blieben deutlich unter den Werten bei den Hausschweinen. Die bei diesen bis zum Eintritt des Todes beobachtete Virämie hielt bei 2 der Wildschweine (Tiere 57 und 58) nur bis ca. 4 Wochen *p.i.* an. Lediglich das dritte Tier (Tier 59) war trotz zwischenzeitlicher klinischer Besserung bis zum Versuchsende virologisch positiv und produzierte, wie auch alle Hausschweine, keine neutralisierenden Ak gegen KSPV. Pathomorphologisch waren im Gegensatz zu den Hausschweinen alle 3 Wildschweine weitgehend unauffällig, was die Stellung einer Verdachtsdiagnose unter Feldbedingungen deutlich erschwert hätte. Der Krankheitsverlauf bei den Wildschweinen ist auf Grund einer Krankheitsdauer von deutlich mehr als 30 Tagen als chronisch einzustufen (Mengeling und Cheville, 1968). Inwieweit bei den Tieren 57 und 58 eine transiente Erkrankung vorlag und zum Zeitpunkt der Tötung vorhandenes KSPV bzw. –Antigen im weiteren Verlauf eliminiert worden wäre, ist schwierig

einschätzbar. Dass bei beiden Tieren zum Versuchsende hin die klinischen Indices wieder anstiegen und bei Tier 58 aus den Mandibularlymphknoten vermehrungsfähiges Virus isoliert werden konnte, spricht eher dafür, dass sich die Tiere in der zweiten Phase eines dreiphasigen chronischen Krankheitsgeschehens befanden, in der es vorübergehend zur Bildung neutralisierender Ak gegen KSPV und zum Verschwinden von vermehrungsfähigem Virus aus dem Serum kommen kann (Mengeling und Packer, 1969). In früheren Infektionsexperimenten mit Hausschweinen wurden ebenfalls solche dreiphasigen Verläufe verzeichnet, bei denen die betroffenen Tiere erst nach mehreren Monaten ohne KSPV-typische pathomorphologische Veränderungen verendeten (Fischer, 1992). Werden Wildschweine im Feld während der rekonvaleszenten zweiten Phase erlegt, so kann sich das Virus, insbesondere bei ausschließlicher Einsatz der Virusisolierung in der Zellkultur, der diagnostischen Nachweisbarkeit entziehen und die KSPV-Infektion der Population somit zunächst unerkannt bleiben. Mittels RT-PCR sollten Tiere, die sich in einer derartigen Infektionsphase befinden, jedoch sicher detektiert werden können. Das Fehlen pathologisch-anatomischer Veränderungen erschwert die Diagnostik zusätzlich, da kein Verdacht auf eine Infektion entsteht. Dies erhöht das Risiko der weiteren Verbreitung im Bestand und der Übertragung auf Hausschweinebestände, da evtl. nicht rechtzeitig Bekämpfungs- und vorbeugende Maßnahmen ergriffen werden.

Tier 59 zeigte einen chronischen Verlauf mit fortdauernder Virämie und Virusausscheidung trotz zwischenzeitlicher klinischer Besserung. Neben persistent infizierten Jungtieren stellen solche chronisch erkrankten Tiere die Hauptursache für das Fortbestehen der KSPV-Infektion innerhalb einer Population dar (Terpstra, 1987). Bei Hausschweinen wurden persistierende Infektionen mit einer Gesamterkrankungsdauer von 152 Tagen beschrieben (Carbrey *et al.*, 1980). Das Verhalten dieser Tiere ist dabei über längere Perioden unauffällig, sie sondern sich nicht von der Rotte ab und sind auch sonst nicht als krank erkennbar. Bereits ab der Inkubationsphase wurde neben der von uns nachgewiesenen Virusausscheidung über das Nasensekret auch die Ausscheidung über Tränenflüssigkeit, Speichel sowie Harn und Kot beschrieben (Kaden, 1999; Kaden, 2000). Auf diese Weise kann die Übertragung von Erregern über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten sowohl innerhalb der Rotte, als auch auf Tiere anderer Rotten erfolgen. Letzteres ist insbesondere dann der Fall, wenn Keiler, vor allem während der Rauschzeit, größere Strecken zurücklegen. Aktionsradien von 6 km (Meynhardt, 1990) bis zu 30 km (Geisser und Bürgin, 1998) sind in der Literatur beschrieben. Wahrscheinlich wird das Virus dabei auch auf die Bache beim Beschlag übertragen. Eine Infektion von Sauen im Zuge der künstlichen Besamung konnte bereits

nachgewiesen werden (Elber *et al.*, 1999). Auf Grund der u.a. in Deutschland vorliegenden hohen Schwarzwilddichte kann eine KSPV-Infektion heutzutage mitunter über lange Zeiträume innerhalb einer Population persistieren, ohne dass es des Neueintrages von Virus aus Hausschweinebeständen oder über die Verfütterung infizierter Abfälle bedarf (Moennig, 2000; Fritzemeier *et al.*, 2000). Chronisch infizierte Tiere, die permanent Virus ausscheiden, unterstützen diesen Vorgang. So bestimmten auch während des Seuchenzuges in Mecklenburg-Vorpommern, aus dem das Isolat 95/1279 stammt, nach anfänglich akutem Geschehen zunehmend chronische und subklinische Verläufe das Bild (Heyne und Kiupel, 1997). Insgesamt erstreckte sich die Verseuchung einiger Gebiete über einen Zeitraum von mehreren Jahren, wobei chronisch infizierte Tiere vermutlich eine bedeutende Rolle beim Erhalt der Infektionskette spielten (Kaden *et al.*, 2005).

Der im Vergleich zu den beiden anderen Tieren im Versuch schwerere KSP-Verlauf bei Tier 59 könnte mit dem zusätzlichen Lungenwurmbefall des Tieres in Zusammenhang gestanden haben. Das Vorhandensein eines sekundären Pathogens übt insbesondere bei Infektionen mit moderat- oder schwachvirulenten KSPV häufig einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Dauer der Virusausscheidung aus (Kaden *et al.*, 1997; Kaden *et al.*, 2004).

Zusammenfassend lassen die Krankheitsverläufe bei den mit Isolat 95/1279 infizierten Wildschweinen auf eine moderate Virulenz des Virus schließen (van Oirschot, 1988; Mittelholzer *et al.*, 2000). An Hand des klinischen Verlaufes zeigte sich somit bei dem vom Schwarzwild stammenden und dort moderat virulenten Feldisolat 95/1279 ein deutlicher Unterschied im Virulenzgrad bei Haus- und Wildschweinen. Dies könnte mit einer Anpassung dieses KSPV an physiologische und immunologische Gegebenheiten der Wildschweine zusammenhängen oder bedeuten, dass Wildschweine auf Grund eben dieser Gegebenheiten generell weniger schwer von einer vergleichbaren Infektion betroffen sind als Hausschweine. So zeigten andere Schwarzwild-Isolate vom Genotyp 2.3 bei Wildschweinen, die verschiedenen Altersgruppen angehörten, ebenfalls eine moderate Virulenz (Kaden *et al.*, 2004). Nach Inokulation eines französischen KSPV-Isolates vom Schwarzwild aus dem Jahre 1990 in Absatzferkel kam es bei 16 von 17 Tieren zu einer akuten bis subakuten Erkrankung mit tödlichem Ausgang (Leforban und Cariolet, 1992). Demgegenüber wurde bei der Infektion junger Frischlinge mit einem Isolat vom Hausschwein jedoch ein mit dem bei Saugferkeln gleichen Alters übereinstimmender akuter Krankheitsverlauf festgestellt (Depner *et al.*, 1995), was gegen ein allgemein mildereres Geschehen bei Wildschweinen spricht. Allerdings verlaufen Infektionen sehr junger Tiere in der Regel schwerwiegend.

### 5.1.2. Infektion mit dem KSPV-Feldisolat E19/99

Bei der Infektion mit dem zweiten Isolat vom Genotyp 2.3 Rostock stimmten die bei den beiden Schweinearten beobachteten Krankheitsbilder, ebenso wie die Höhe der Körpertemperaturen sowie der klinischen Indices weitgehend überein. Hinsichtlich der Erkrankungsdauer war der Verlauf bei einem der beiden Wildschweine akut, bei allen anderen Tieren im Versuch subakut. In allen Fällen endete die Erkrankung mit dem Tod des Tieres. Im Blut beider Wildschweine gelang trotzdem ab dem 12. *d p.i.* die Detektion neutralisierender Ak gegen KSPV. Dies steht im Gegensatz zu allen Infektionen von Hausschweinen, bei denen bei letalem Ausgang niemals ein Ak-Titer messbar war. Es ist allerdings keine Seltenheit, dass Schweine, die Ak gegen KSPV produzieren, trotzdem verenden (Mengeling, 1970; Liess *et al.*, 1976; Korn, 1980). Bemerkenswert ist weiterhin, dass in den Organen der beiden Wildschweine erst mit Hilfe der n-PCR Virusantigen nachgewiesen wurde. Auch dies könnte in Zusammenhang mit der Produktion neutralisierender Ak stehen, die evtl. eine Eliminierung von vermehrungsfähigem Virus aus dem Gewebe nach sich zog. Beide Tiere verendeten erst einige Tage nach der letzten Probenahme, bei der der KSPV-Nachweis mit Hilfe der Virusanzucht in Blut und Nasentupferproben noch bei beiden Tieren geführt werden konnte. Zu einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes bei den Wildschweinen könnte das Vorhandensein von Sekundärerregern beigetragen haben (Kaden *et al.*, 1997; Kaden *et al.*, 1999b; Kaden *et al.*, 2004), wie die postmortale Isolierung von *Pasteurella multocida* aus der Lunge eines der Tiere zeigt (s. 4.1.4.2. ). Die bei beiden Wildschweinen zu beobachtenden hgr. Atemstörungen unterstützen diese Vermutung.

Im Gegensatz zum Infektionsexperiment mit Isolat 95/1279 zeigte das KSPV E19/99 bei beiden Schweinearten übereinstimmend hochvirulente Eigenschaften. Es stammt aus einem Gebiet, in dem zum Zeitpunkt der Isolierung nach vorübergehender Abschwächung der Symptomatik wieder ein akutes Geschehen im Bestand mit Fallwild und sichtbar erkrankten Tieren vorherrschte. Die hier beschriebenen Ergebnisse stimmen also mit den Beobachtungen im Feld überein. Auffällig ist das Auftreten neutralisierender Ak gegen KSPV bei den Wildschweinen trotz tödlichen Krankheitsausgangs. Es könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Reaktionsmuster des Immunsystems bei Haus- und Wildschweinen trotz vergleichbaren klinischen Bildes sein.

### 5.1.3. Infektion mit dem KSPV-Feldisolat *E15/98*

Die Infektion mit dem Isolat *E15/98* führte bei den Hausschweinen ebenfalls zu einem subakuten Krankheitsbild, während zwischen den 5 Wildschweinen Abstufungen in der Ausprägung des klinischen Geschehens auftraten. Zwar machten alle Tiere zunächst eine Krankheitsphase mit Fieber und unterschiedlich schweren klinischen Erscheinungen durch, doch verendeten lediglich 3 der 5 Wildschweine nach akutem bzw. subakutem Verlauf. Zwar blieb die Höhe der klinischen Indices dieser Wildschweine hinter der ebenfalls subakut erkrankten Hausschweine zurück. Als Grund hierfür kommt jedoch u.a. in Frage, dass die Stärke von Hautveränderungen bei Wildschweinen durch die Pigmentierung und die Dichte des Haarkleides praktisch nicht beurteilbar ist und somit auch nicht in die Festsetzung des Index einfluss. Die verbliebenen 2 Tiere erholten sich klinisch vollständig und waren am Ende des Experiments virusfrei und pathomorphologisch unauffällig. Allerdings konnte virale RNA bis zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Eine solche Nachweisbarkeit von RNA trotz negativer Virusanzucht wurde auch im Rahmen eines Methodenvergleiches für den Nachweis unterschiedlich virulenter KSPV bei der Infektion mit dem schwachvirulenten Stamm *Glentorf* festgestellt (Handel *et al.*, 2004).

Die Erkrankung verlief bei den beiden letztgenannten Tieren transient. Bei den 5 Wildschweinen traten somit 3 voneinander abweichende Verlaufsformen auf: akuter, subakuter und transienter Verlauf. Die Einordnung des Isolates in eine bestimmte Virulenzklasse gestaltete sich auf Grund dessen schwierig. Akute und subakute Verläufe sind Anzeichen für eine hohe, transiente für eine geringere Virulenz. Die von Mittelholzer *et al.* (2000) vorgeschlagenen Kriterien zur Virulenzcharakterisierung setzen voraus, dass die durch ein bestimmtes KSPV ausgelöste klinische Symptomatik bei allen untersuchten Tieren übereinstimmt. Die hier vorliegende Variabilität in der Krankheitsausprägung kann Folge der unterschiedlichen körperlichen Konstitution der Wildschweine und daraus resultierender physiologischer und immunkonditioneller Unterschiede sein. 2 der verendeten, aber auch eines der beiden überlebenden Tiere wiesen zum Zeitpunkt der Infektion eine Körpermasse von weniger als 10 kg auf, während das zweite überlebende Tier deutlich mehr als 10 kg wog. Bei diesem Tier war die klinische Symptomatik mit einem maximalen klinischen Index von 5 am geringsten ausgeprägt. Im Falle einer transienten KSP sind spezifische Symptome häufig schwächer oder können gänzlich fehlen. Eine für Tierexperimente zur Virulenzcharakterisierung eigentlich erforderliche Standardisierung des Tiermaterials (van Oirschot, 1988; Dahle und Liess, 1995) war für die Wildschweine, bei denen es sich ausschließlich um Wildfänge handelte, unter den gegebenen Umständen nicht realisierbar.

Gleichwohl scheinen wirtsspezifische Unterschiede nicht der alleinige Grund für eine differierende Symptomatik zu sein. Bei in Rasse und Alter identischen Absatzferkeln, die mit verschiedenen KSPV der Genotypgruppe 2 infiziert wurden, reichten die Schwankungsbreiten klinischer Verläufe mitunter ebenfalls von akutem Verenden bis zu milden Erscheinungsformen mit kompletter Genesung (Depner *et al.*, 1996; Floegel-Niesmann *et al.*, 2003). Für Isolate, die ein derartig variables Krankheitsbild generieren, wurde in Ergänzung der von Mittelholzer *et al.* (2000) vorgenommenen Einteilung die Zuordnung zu den moderatvirulenten KSPV vorgeschlagen (Floegel-Niesmann *et al.*, 2003). Dies entspricht auch früheren Auffassungen (van Oirschot, 1988). In den von Mittelholzer *et al.* (2000) durchgeführten Versuchen riefen die als moderatvirulent eingestuft Stämme einheitlich transiente Erkrankungsformen hervor. Dass es sich um SPF-Tiere mit übereinstimmendem mikrobiellem Status handelte, könnte ebenso ein Grund dafür sein wie die sehr geringe Tierzahl von nur 2 Schweinen je Virusisolat.

Wie schon bei Isolat 95/1279 zeigte sich auch bei Isolat E15/98 ein deutlicher Unterschied in der Virulenz bei Haus- und Wildschweinen. Im Gegensatz zum Isolat 95/1279 stammt letzteres jedoch aus dem Bundesland Brandenburg, wo zum Isolierungszeitpunkt ein akutes KSP-Geschehen beim Schwarzwild vorherrschte (Letz, 1997). 3 der Tiere im hier beschriebenen Versuch (60%) entwickelten ein entsprechendes klinisches Bild. Die beiden rekonvaleszenten Tiere durchliefen ebenfalls eine vorübergehende akute Krankheitsphase. Im Hinblick auf die Diversität der Tiere in einem Schwarzwildbestand muss davon ausgegangen werden, dass auch dort trotz dem Anschein nach überwiegend akuten Geschehens mildere Verlaufsformen auftreten, bei denen KSPV-Antigen über längere Zeiträume in den infizierten Tieren erhalten bleibt, ohne mit den „klassischen“ Methoden der Virusanzucht nachweisbar zu sein.

#### **5.1.4. Vergleichende Betrachtung der durchgeführten Tierexperimente - Möglichkeiten und Grenzen ihrer Anwendung zur Virulenzcharakterisierung der KSPV-Feldisolate**

Unabhängig vom späteren Verlauf war die Dauer der Inkubationszeit bezogen auf den Tag des Fieberbeginns mit 4 bis 5 Tagen in allen Experimenten gleich. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Depner *et al.*, 1997c). Bei Bunzenthal *et al.* (2003) hingegen variierte die Inkubationszeit bei der Infektion mit unterschiedlichen KSPV zwischen 3 und 8 Tagen, wobei jedoch kein Zusammenhang zur im Experiment ermittelten Virulenz der Virusisolate festzustellen war.

Bei der Infektion von Hausschweinen ergaben sich für alle untersuchten Feldisolate vom Genotyp 2.3 klinische Indices und Körpertemperaturen, die die Viren nach den Kriterien von Mittelholzer *et al.* (2000) als hochvirulent charakterisierten. Zur weitgehenden Einheitlichkeit des klinischen Bildes trug dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit bei, dass die eingesetzten Tiere derselben Rasse und Altersgruppe angehörten und somit auch ähnliche physiologische und immunologische Voraussetzungen mitbrachten. Die Überlebensdauer der Tiere in den hier beschriebenen Experimenten lag mit im Durchschnitt 21 bis 25 Tagen mehr als 10 Tage höher als in den von Mittelholzer *et al.* (2000) mit hochvirulenten KSPV vom Genotyp 1 durchgeführten Versuchen. Die von diesen Autoren applizierte Infektionsdosis von  $10^6$  KID<sub>50</sub> lag dabei um 1,5 log-Stufen über der von uns eingesetzten Dosis. Die Höhe der Virusdosis kann den Verlauf einer KSPV-Infektion beeinflussen (Liess, 1987; Dahle und Liess, 1995). Allerdings gelang es Mittelholzer *et al.* (2000) in einem vorausgehenden Experiment, mit einer hohen und einer niedrigen Dosis des Stammes *Alfort 187* nahezu identische klinische Indices und Körpertemperaturen bei den infizierten Tieren zu induzieren.

Außerdem gelten die jüngeren Feldisolate vom Genotyp 2 allgemein als geringer virulent als die „alten“, heute häufig als Referenzstämme genutzten Isolate vom Typ 1. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass sich die Diagnosestellung in von KSP betroffenen Schweinehaltungen heutzutage häufig als schwierig erweist (Sandvik *et al.*, 2000; Terpstra und De Smit, 2000). Im Rahmen experimenteller Infektionen von Hausschweinen derselben Altersgruppe, wie sie in den hier beschriebenen Experimenten eingesetzt wurde, traten neben akuten und subakuten auch chronische sowie transiente Erkrankungsformen auf. Der Grad des Krankheitsbildes differierte dabei trotz einheitlichen Tiermaterials zum Teil auch zwischen Tieren, die mit ein und demselben Isolat infiziert worden waren (Depner *et al.*, 1994; Depner *et al.*, 1996; Floegel-Niesmann *et al.*, 2003). Auch Bunzenthal *et al.* (2003) registrierten bei der Infektion von Hausschweinen mit aktuellen Feldvirusisolaten der Genotypen 2.1, 1.3 und 1.1 eine hohe Variationsbreite in der klinischen Symptomatik. Bei einem KSPV vom Genotyp 2.3 Uelzen hingegen entwickelten, übereinstimmend mit den hier durchgeführten Versuchen, alle Tiere eine akut-letale Verlaufsform. Bei allen dort verwendeten KSPV handelte es sich um Isolate vom Hausschwein. Inwiefern evtl. eine Anpassung der Viren an immunologische Reaktionsmuster des Wirtes, wie bereits unter 5.1.1. erwähnt, besteht, bleibt an dieser Stelle Gegenstand der Spekulation.

Bei insgesamt in gleicher Intensität erkrankten Tieren aus unterschiedlichen Versuchsanordnungen können weiterhin einzelne klinische Symptome in ihrer Stärke differieren. So beobachteten Floegel-Niesmann *et al.* (2003) bei der Infektion von

Absatzferkeln mit verschiedenen Feldisolaten vom Genotyp 2 in geringerer Ausprägung und erst zu einem späteren Zeitpunkt *p.i.* respiratorische Störungen, als dies in den hier beschriebenen Experimenten der Fall war. Neurologische Ausfallserscheinungen, die in den hier durchgeführten Versuchen nur gelegentlich im Terminalstadium der Erkrankung ab ca. 3 Wochen nach der Infektion auftraten, spielten in dieser Studie hingegen während des gesamten Verlaufes eine Rolle. Ursächlich könnten für solche Unterschiede neben virusbedingten Faktoren wirtsseitige Merkmale, wie z.B. rassebedingte Konstitutionsunterschiede zwischen den verwendeten Tieren (Depner *et al.*, 1997a) in Frage kommen. So wurden die Versuche von Floegel-Niesmann *et al.* (2003) mit Schweinen der Deutschen Landrasse durchgeführt, in den hier beschriebenen Experimenten kamen Kreuzungstiere zum Einsatz (s. 3.11.1. ).

Während die von uns untersuchten KSPV in Hausschweinen durchgehend eine hohe Virulenz zeigten, traten in den Experimenten mit Wildschweinen verschiedene Verlaufsformen und eine entsprechend abweichende Virulenzeinstufung auf. Vor allem für die Isolate 95/1279 und E15/98 war der bei den Wildschweinen ermittelte Virulenzgrad deutlich niedriger. Zusammenfassend kann die Virulenz der untersuchten Isolate für Wildschweine als moderat bezeichnet werden. Auch Kaden (1999) stellte fest, dass die Klinik der KSP beim Schwarzwild im Vergleich zum Hausschwein häufig verzögert eintritt und über einen längeren Zeitraum andauert. An Hand von Infektionsversuchen mit Wildschweinen unterschiedlichen Alters wurden weiterhin 2 vom Wildschwein isolierte KSPV des Genotypes 2.3 ebenfalls als moderatvirulent charakterisiert (Kaden *et al.*, 2004). Im Rahmen des Seuchengeschehens der 1990er Jahre in Mecklenburg-Vorpommern, aus dem 2 der hier verwendeten Isolate stammen, wurden neben klassischen auch protrahierte und chronische Verläufe und damit eine überwiegend moderate Virulenz der im Feld kursierenden Viren festgestellt (Heyne und Kiupel, 1997; Kaden, 1998).

Lediglich für das KSPV-Isolat E19/99 stimmt letztlich der für Haus- und Wildschweine ermittelte Virulenzgrad weitgehend überein. Das evtl. Vorhandensein eines sekundären Pathogens bei den Wildschweinen bleibt dabei zu bedenken. Ohne eine solche zusätzliche Belastung wäre bei den Wildschweinen möglicherweise auch in diesem Experiment ein milderer Krankheitsgeschehen als bei den Hausschweinen aufgetreten. Für die beiden anderen getesteten Viren bestehen bemerkenswerte Virulenzunterschiede. Genetisch bedingte Differenzierungen in der Reaktion des Immunsystems zwischen beiden Arten könnten daran ursächlich beteiligt sein (Dahle und Liess, 1995; Depner *et al.*, 1997a). So erbrachte die hier beschriebene Studie, dass die Wildschweine trotz akut-letalen Verlaufes neutralisierende Ak



synthetisierten, die Hausschweine jedoch nicht. Solche Unterschiede kommen gleichermaßen als Grund für voneinander abweichende Krankheitsbilder in Frage, wie sie mitunter im Rahmen von Feldinfektionen beobachtet werden können. Auch beim jüngsten Ausbruch der KSP in der Hausschweinepopulation in Nordrhein-Westfalen im Frühjahr 2006 traten mehrheitlich akute Verlaufsformen auf. Das verursachende Virus erwies sich als genetisch übereinstimmend mit Erregern vom Genotyp 2.3 Güstrow, die in der Schwarzwildpopulation Mecklenburg-Vorpommerns in den 1990er Jahren aufgetreten waren, wo, wie bereits ausgeführt, ein überwiegend moderates Krankheitsgeschehen beobachtet worden war. Mildere Verläufe zu Beginn der aktuellen Endemie bei Hausschweinen erklären sich aus dem mutmaßlichen Übertragungsweg über tiefgekühlt gelagertes Wildschweinefleisch. Durch die lange Lagerdauer könnte es zu einer Virulenzabschwächung gekommen sein (Heilemann, persönliche Mitteilung; Bundesministerium für Ernährung, 2006).

Speziell in den hier durchgeführten Versuchen dürften außerdem Altersunterschiede eine Rolle gespielt haben. Die verwendeten Wildschweine waren in der Regel älter als die Hausschweine, und ältere Tiere sind von Infektionen im Allgemeinen in geringerem Ausmaß betroffen (van Oirschot, 1988; Dahle und Liess, 1995).

Im Hinblick auf den Verlauf der Seuche im Schwarzwildbestand stellt sich die Frage, inwiefern dieser durch eine moderate oder schwache Virulenz der kursierenden Feldviren beeinflusst werden kann. Wie auch schon in Abschnitt 5.1.1. ausgeführt, erschwert ein geringerer Virulenzgrad u. U. die Diagnosestellung, da die betroffenen Tiere zum einen nicht verhaltensauffällig sind. Zum anderen bleibt der Virustiter im Blut häufig niedrig bzw. ist in der klinischen Erholungsphase während eines chronischen Verlaufes überhaupt kein vermehrungsfähiges Virus nachweisbar (Mengeling und Packer, 1969). Dies war auch bei 2 der mit Feldisolat 95/1279 infizierten Wildschweine der Fall. Ähnlich verhält es sich, wie auch in den hier beschriebenen Versuchen dargestellt werden konnte, mit dem Vorhandensein pathologisch-anatomischer Veränderungen. Distinkte Symptome treten erst auf, wenn Tiere z.B. unter dem Einfluss von Stress oder sekundären Pathogenen schwerer erkranken oder es, wie auch bei den von uns getesteten Isolaten der Fall, bei der Einschleppung in Hausschweinebestände zu einer Virulenzsteigerung kommt. Ein moderat- oder schwachvirulentes Virus kann sich so bereits weit im Bestand verbreitet haben, ehe eine Diagnosestellung erfolgt. Wird eine tragende Bache mit schwachvirulentem KSPV infiziert, ist die Übertragung des Virus auf die Feten trotz symptomlosen Krankheitsverlaufes bei der Bache selbst wahrscheinlich. Die Frischlinge könnten später als persistent infizierte Ausscheider zur Ausbreitung der Epidemie beitragen (Terpstra, 1987; Liess, 1987; Kern *et*

*al.*, 1999). Allerdings haben die Ergebnisse neuerer Untersuchungen gezeigt, dass die Bedeutung dieses Verbreitungsweges offensichtlich in der Vergangenheit überschätzt wurde (Kaden *et al.*, 2005).

Bei Seuchenverdacht ist in jedem Falle eine gründliche virologische und serologische Untersuchung aller geschossenen Stücke sowie des Fallwildes vonnöten, auch wenn klinische bzw. pathomorphologische Befunde nicht den Verdacht auf eine KSP-Infektion nahelegen. Gleiches gilt für Immunisierungsgebiete. Bei gleichzeitiger o.I. und Infektion mit schwachvirulentem Virus scheint es zu einer weiteren Abschwächung der pathogenen Eigenschaften des Virus kommen zu können (Schurig, 1999; Kaden *et al.*, 2001). Hier spielt die Erkennung infizierter Tiere durch Virusisolierung eine besondere Rolle, da keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Impfvirus- und Feldvirus-induzierten Ak besteht (Schurig, 1999).

Gegenstand der durchgeführten Tierexperimente war die Virulenzcharakterisierung von KSPV. Die erhaltenen Ergebnisse unterstreichen deren Wichtigkeit für Vorhersagen über den Fortgang einer Epidemie. Die Virulenz spielt neben weiteren Einflussfaktoren wie dem geografischen Profil und der Populationsdichte eine wichtige Rolle im Verlauf eines Seuchenzuges innerhalb einer Schwarzwildpopulation (Kaden, 1999; Moennig, 2000). Mit ihr variiert die Letalitätsrate sowie die Dauer der Infektiosität beim Einzeltier (Laddomada, 2000). Die unterschiedliche Pathogenität bei Haus- und Wildschweinen weist auf die Beeinflussung der Infektionsabläufe durch individuelle Wirtsfaktoren hin. Das Auftreten eines bestimmten Virulenzgrades *in vivo* ist an die konstitutionellen und konditionellen Voraussetzungen der infizierten Tiere gebunden (Depner *et al.*, 1996; Depner *et al.*, 1997c). Der Übertragbarkeit von Tierversuchsergebnissen auf andere Tiergruppen mit abweichenden Eigenschaften sind somit deutliche Grenzen gesetzt. Da die Krankheitssymptomatik auch zwischen Einzeltieren einer weitgehend homogenen Gruppe variieren kann, ist weiterhin vom Verlauf beim Einzeltier kein allgemeingültiger Schluss auf die Virulenz eines Virusisolates für alle Tiere mit diesen Eigenschaften möglich. Lediglich für avirulente KSPV ist die Virulenz *in vivo* eindeutig bestimmbar (Fischer, 1992). Die Anzahl der in den hier dargestellten Versuchen verwendeten Tiere war mit 2 bis 5 relativ gering. Ähnliches gilt für Mittelholzer *et al.* (2000) mit nur 2 Tieren je Virusisolat. Um einen umfassenden Überblick über alle bei der Infektion mit einem bestimmten Virusisolat auftretenden Krankheitsausprägungen zu erhalten, müsste die Tierzahl entsprechend erhöht werden bzw. die Möglichkeit bestehen, aus einem größeren Pool von Tieren zu wählen. Tierexperimente in solchen Dimensionen stehen jedoch ethische Gesichtspunkte entgegen. Ein Tierversuch zur

Charakterisierung der Virulenz eines KSPV im Rahmen der vertretbaren Möglichkeiten kann deshalb immer nur als Anhaltspunkt gelten und erlaubt keine absolute Aussage über den Virulenzgrad. Um dennoch verwertbare Informationen zu erhalten, sollten die Tiere im Versuch in ihren Eigenschaften möglichst exakt mit denen übereinstimmen, für die die Ergebnisse unter Praxisbedingungen Anwendung finden sollen. Die Festlegung des Pathogenitätsgrades eines vom Schwarzwild isolierten KSPV im Rahmen von Bekämpfungsmaßnahmen sollte auch an Wildschweinen vorgenommen werden. An Hausschweinen gewonnene Ergebnisse sind den hier beschriebenen Untersuchungen zufolge nicht ohne weiteres auf Wildschweine übertragbar und umgekehrt. Gleichzeitig ist jedoch auch die Charakterisierung in Hausschweinen im Hinblick auf mögliche Folgen eines Übergreifens der Seuche auf Hausschweinebestände von Interesse. Die Übertragung von KSPV vom Schwarzwild gewinnt im Seuchengeschehen bei Hausschweinen u.a. in Deutschland zunehmend an Bedeutung (Fritzemeier *et al.*, 1998; 2000). Dies geht auch aus Untersuchungen zur phäno- und genotypischen Klassifizierung der Isolate hervor (Kaden, 1998). Verläuft die KSP, wie in den hier vorgestellten Experimenten, beim Hausschwein vorwiegend akut, so wird sie in der Regel schnell erkannt und getilgt. Ist ihr Erscheinungsbild jedoch eher mild oder subklinisch, wie häufig in Seuchenzügen der jüngeren Vergangenheit, so kann es zur unbemerkten Verbreitung innerhalb der Hausschweinepopulation und zum Übergreifen auf weitere Gebiete oder sogar andere Staaten kommen. Dies war z.B. im Zuge der KSP-Epidemie 1997-98 in den Niederlanden der Fall (Elber *et al.*, 1999).

### **5.2. Laborexperimentelle Studien**

#### **5.2.1. Ein-Schritt-Wachstumskinetiken**

##### **5.2.1.1. Titerverhältnis zwischen zellgebundenem und zellfreiem Virus**

Die Durchführung der Wachstumskinetiken diente dem Vergleich des Replikationsverhaltens der im Tierversuch charakterisierten Virusisolate vom Genotyp 2.3 untereinander und mit dem älteren, heute nicht mehr im Feld vorkommender KSPV-Stämme unterschiedlicher Virulenzgrade vom Genotyp 1.1. Das zusätzlich in diese Untersuchungen einbezogene Feldisolat *Spante* verhielt sich im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit getesteten Isolaten bei experimentell infizierten Haus- und Wildschweinen schwachvirulent und wies eine nur ggr. immunisierende Wirkung auf (Kaden *et al.*, 2000c). Lediglich 2 von 3 der mit dem Isolat infizierten Hausschweine sowie eines von 3 Kontakttieren serokonvertierten,

während die beiden infizierten Wildschweine nach der Infektion keine Ak gegen KSPV ausbildeten.

Hinsichtlich allgemeiner Kriterien zum Verlauf der Wachstumskinetiken, wie der Dauer des exponentiellen Wachstums oder dem Zeitpunkt des Beginns der Plateauphase stimmen die hier dargestellten Resultate mit denen von Mittelholzer *et al.* (2000) überein. Die 48 h *p.i.* erreichten Endtiter in der ZK lagen bei den von uns getesteten KSPV-Stämmen des Genotyps 1.1 virulenzunabhängig ca. eine log-Stufe über denen der Isolate vom Genotyp 2.3., bei denen der Kurvenverlauf insgesamt deutlich flacher ausfiel. Mittelholzer *et al.* (2000) registrierten hingegen für die von ihnen untersuchten hochvirulenten Isolate, die alle dem Genotyp 1 angehörten, im Vergleich zu den weniger virulenten flachere Kurven und geringere Maximaltiter. Als möglicher Grund dafür wird von den Autoren die langsamere Produktion von Virusnachkommenschaft genannt. Kurvenverläufe und Endtiter des zellfreien Virus stimmen bei allen von uns untersuchten KSPV weitgehend überein. Mittelholzer *et al.* (2000) kamen zu ähnlichen Resultaten.

Der aus den mittleren Virustitern beider Kompartimente berechnete Index (s. 3.12.1.5.1. ) lag für die Laborstämme vom Genotyp 1.1 bei -1,45 bis -0,85. Der mittlere zellgebundene Virustiter war bei allen Stämmen deutlich höher als der im ZKÜ. Virulenzabhängige Unterschiede traten hierbei nicht auf. Für die Feldisolate des Genotypes 2.3 betrug der Index -0,28 bis 0,32, das Titerverhältnis war somit nahezu ausgeglichen. Den höchsten Index und damit auch den im Verhältnis höchsten zellfreien Virustiter wies das im Tierversuch am schwächsten virulente Isolat *Spante* auf. Die Unterschiede zwischen den Indices der KSPV beider Genotypen waren signifikant (vgl. 4.2.1.1.4. ). In den Untersuchungen von Mittelholzer *et al.* (2000) hingegen lag der Anteil des in den ZKÜ sezernierten Virus verglichen mit dem zellgebundenen Anteil für hochvirulente KSPV stets höher als für moderat- oder avirulente Stämme. Allerdings waren mitunter beträchtliche Titterschwankungen zwischen verschiedenen Ansätzen für ein und dasselbe Virus zu verzeichnen, weswegen die Mitführung eines Referenzvirus empfohlen wurde. In den hier beschriebenen Experimenten variierten die ermittelten absoluten Titer nur in relativ geringem Umfang. Während Mittelholzer *et al.* (2000) virulenzabhängige Unterschiede im Wachstum der von ihnen untersuchten KSPV feststellen konnten, deuten die hier vorgestellten Ergebnisse auf eine Beziehung des Vermehrungsverhaltens zum Genotyp des betreffenden Virus hin. Die im Verlauf der Kinetiken zu jedem einzelnen Probenahmezeitpunkt berechneten Titerverhältnisse bestätigten diese Beziehung. Aus ihnen abgeleitete Kurven bildeten 2 mit dem jeweiligen Genotyp der betreffenden Viren übereinstimmende, getrennte

Kurvenscharen. Die Zahlenwerte für die Feldisolate des Genotyps 2.3 waren dabei höher als jene für die Laborstämme vom Genotyp 1.1, was den in Relation höheren Anteil von zellfreiem Virus bei den jüngeren Feldisolaten widerspiegelt. Die Titerverhältnisse der beiden unterschiedlichen Genotypen angehörenden KSPV unterschieden sich dabei bis auf wenige Ausnahmen zu den frühen Probenahmezeitpunkten signifikant (s. 4.2.1.1.4. ).

Hinsichtlich der Wachstumskinetiken einiger auch von Mittelholzer *et al.* (2000) verwendeten KSPV vom Genotyp 1 besteht eine partielle Übereinstimmung mit den hier dargestellten Resultaten (negativer Index), teilweise liegen aber auch entgegengesetzte Verhältnisse vor. Der einzige von Mittelholzer *et al.* (2000) getestete KSPV-Stamm vom Genotyp 2, der Stamm *Kerzers*, wies im Gegensatz zu den von uns untersuchten Typ 2-Isolaten einen negativen Index auf. Solche Abweichungen können u.a. in Zusammenhang mit der Verwendung verschiedener Zelllinien stehen. Wir setzten PK-15-Zellen ein, Mittelholzer *et al.* (2000) SK-6-Zellen. Bei Untersuchungen zum Verhältnis zwischen zellgebundenem und zellfreiem Virus für die KSPV-Stämme *Eystrup* und *C-Stamm* wurde *Eystrup* in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie teilweise überwiegend zellgebunden, teilweise frei im ZKÜ gefunden (Fischer, 2001). Für PK-15-Zellen stimmten die Verhältnisse dabei mit den hier durchgeführten Versuchen überein (negativer Index). *C-Stamm*-Virus hingegen lag in allen verwendeten Zelllinien zu einem größeren Anteil zellfrei vor, was den hier dargestellten Ergebnissen widerspricht, nach denen dieses als zum Genotyp 1.1 gehörendes KSPV vorwiegend zellgebunden bleibt. Allerdings wählte Fischer (2001) nur 2 Probenahmezeitpunkte, von denen lediglich einer (48 h *p.i.*) im Zeitraum der hier durchgeführten Probenahmen lag.

Weiterhin kann die Höhe des Virustiters in der ZK durch die Art und Weise der Aufbereitung der Zellsuspension beeinflusst werden. Im Rahmen elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde eine feste Bindung freigesetzter Viruspartikel an die Zelloberfläche festgestellt (Weiland *et al.*, 1999), die offenbar nur durch stärkere mechanische Einwirkungen aufgehoben werden kann. Während Fischer (2001) und auch Mittelholzer *et al.* (2000) zu diesem Zweck einen zweimaligen Gefrier-Tau-Zyklus durchführten, unterzogen wir die Zellen zusätzlich einer Ultraschallbehandlung, was eine effektivere Trennung der Viren vom Zelldetritus bewirken sollte. Laut Mengeling und Drake (1969) besteht zwischen einer ausschließlichen Gefrier-Tau- oder Ultraschallbehandlung kein wesentlicher Effizienzunterschied. Danner und Bachmann (1970) untersuchten ebenfalls das Wachstum des zu den alten Isolaten von vor 1970 gehörenden hochvirulenten KSPV-Stammes *München-1* in PK-15-Zellkultur und mit kombinierter Gefrier-Tau- und

Ultraschallbehandlung. In Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Resultaten fanden auch sie einen höheren Anteil an zellgebundenem Virus. Gleiches ergab sich bei der Durchführung nur eines Gefriertauzyklus für die Wachstumskinetik des hochvirulenten KSPV *Alfort* auf PK-15-Zellen (Laude, 1977). Hingegen wies der ebenfalls hochvirulente und zu den vor 1970 isolierten KSPV gehörende Stamm *Ames* in PK-15-Zellen nach 2-maligem Gefrier-Tau-Zyklus einen höheren Anteil an zellfreiem Virus auf (Mengeling und Drake, 1969).

Schließlich kann auch die Inokulationsdosis Einfluss auf den Verlauf einer Ein-Schritt-Vermehrungskurve nehmen. In den meisten der hier aufgeführten Arbeiten wurden  $m.o.i. \geq 1$  verwendet, während z.B. Fischer (2001) mit einer  $m.o.i. < 1$  infizierte. Insgesamt wird deutlich, dass die Ergebnisse von Wachstumskinetiken stark von den Bedingungen abhängen, unter denen diese erstellt werden.

Während in den hier durchgeführten Untersuchungen ausschließlich nur über wenige Zellkulturpassagen geführte Wildtypviren Verwendung fanden, arbeiteten Mittelholzer *et al.* (2000) zum Teil mit durch Rekombination aus cDNA hergestellten bzw. durch Austausch des N<sup>pro</sup>-Gens gegen das murine Ubiquitin-Gen attenuierten oder aus permanent infizierten Zelllinien isolierten Viren. Dies erschwert den Vergleich der Ergebnisse, da nicht auszuschließen ist, dass das Verhalten rekombinanter Viren in Zellkultur grundsätzlich und unabhängig vom Virulenzgrad von dem im Feld bzw. aus infizierten Tieren isolierter KSPV abweicht. Auch in anderen Arbeiten, die sich mit der Virulenzcharakterisierung mit Hilfe von Labormethoden befassten, fanden durch Lapinisierung, Dauerpassagierung auf Zellkulturen oder die permanente Infektion von Zellen in ihrer Virulenz abgeschwächte KSPV Verwendung (Kubin, 1967; Pirtle und Kniazeff, 1968; Aynaud, 1969; Aynaud *et al.*, 1972; Nakamura *et al.*, 1983). Es ist daher als wahrscheinlich anzusehen, dass es bei im Labor attenuierten Viren im Zuge einer Adaptation an die Kultivierungsbedingungen zu gegenüber hochvirulenten, nicht adaptierten Viren veränderten Wachstumseigenschaften kommt. Diese stehen somit möglicherweise nicht in direktem Zusammenhang mit dem Virulenzgrad. So ließen sich eine kürzere Latenzperiode und höhere Maximaltiter bei dem hochvirulenten KSPV-Stamm *Ames* bereits nach 27 Zellkulturpassagen feststellen (Mengeling und Drake, 1969). Die Virulenzeigenschaften blieben dabei zunächst unverändert. Ein durch Zellkulturadaptation generiertes Impfvirus wies ebenfalls eine höhere Infektionsrate verschiedener Zelllinien auf als ein aus einem infizierten Tier gewonnenes hochvirulentes Isolat (Pirtle und Kniazeff, 1968). In anderen Untersuchungen zeichneten sich wiederum attenuierte Vakzinestämme verglichen mit vollvirulenten KSPV durch eine langsamere Vermehrung und geringere Titer aus (Aynaud *et al.*, 1972). Ein schwachvirulentes Feldisolat

unterschied sich in seinen Replikationseigenschaften hingegen kaum von den hochvirulenten Vertretern. In einer weiteren Arbeit erfolgte der Vergleich der Infizierbarkeit von Alveolarmakrophagenkulturen mit hochvirulenten Feldstämmen einerseits und mehr als 100mal auf Zellkulturen passagierten schwach- bzw. avirulenten KSPV andererseits (Nakamura *et al.*, 1983). Ob auf diese Weise auch ein Unterschied zwischen hoch- und schwachvirulenten Feldisolaten herausgearbeitet werden kann, bleibt fraglich. In den hier dargestellten Experimenten zum *in vitro*-Wachstum ist ein solcher nicht erkennbar. Vielmehr hängt das Verhältnis zwischen zellgebundenem und zellfreiem Virus in der Wachstumskinetik vom Genotyp des betreffenden KSPV ab. Ähnliches wurde bereits früher für das nahe verwandte BVDV im Hinblick auf antigene Eigenschaften und *in vitro*-Wachstum festgestellt (Hafez und Liess, 1972). 3 nahe verwandte BVDV zeigten längere Latenzphasen, einen flacheren Anstieg des extrazellulären Virustiters sowie ein späteres Auftreten eines CPE als der antigenetisch differente Referenzstamm *Oregon C 24 V*. Ungeachtet der Tatsache, dass einzelsträngige RNA-Viren gewöhnlich raschen genetischen Veränderungen unterliegen, sind die pestiviralen Antigene erstaunlich gut konserviert (Moennig, 1990). Gleiches gilt wahrscheinlich für den Genomaufbau als solchen. Im Verlauf von mehreren Jahren innerhalb einer bestimmten Region isolierte KSPV stimmten genetisch weitgehend überein, obgleich sie Ausbrüchen unterschiedlicher Schwere zugeordnet werden konnten (Vilcek und Paton, 1998). Im Gegensatz dazu stellt die Virulenz eine veränderliche, in hohem Maße von äußeren Einflüssen, in erster Linie Wirtsfaktoren abhängige Eigenschaft dar (Korn, 1965; van Oirschot, 1988; Dahle und Liess, 1995; Depner *et al.*, 1996). Das *in vitro*-Verhalten nicht zellkulturadaptierter KSPV scheint somit eher in Beziehung zu deren genetischer Beschaffenheit zu stehen als zu ihrer Virulenz.

Merkmale, die in jüngerer Vergangenheit mit dem Pathogenitätsgrad in Zusammenhang gebracht wurden, sind u.a. die RNase-Aktivität des Glykoproteins E<sup>ns</sup> oder das Vorhandensein der Autoprotease N<sup>pro</sup>. *In vivo* erwiesen sich RNase-negative Mutanten hochvirulenter KSPV-Stämme als in ihrer Virulenz deutlich abgeschwächt bis apathogen (Meyers *et al.*, 1999), N<sup>pro</sup>-Deletionsmutanten als vollständig attenuiert (Mayer *et al.*, 2004). Der Austausch des N<sup>pro</sup>-Gens des hochvirulenten KSPV-Stammes *Eystrup* gegen das des Vaccinestammes *Riems* führte jedoch nicht zu einer Veränderung der Virulenzeigenschaften von *Eystrup*. Die Beschaffenheit der entsprechenden Sequenz nimmt somit keinen Einfluss auf den Grad der Virulenz. Weiterhin unterschieden sich die Wachstumseigenschaften der veränderten Viren in Zellkultur nicht von denen der Wildtypviren (Tratschin *et al.*, 1998; Hulst *et al.*, 1998).

Ähnlich verhielt es sich bei Mutanten eines infektiösen Klons des hochvirulenten Stammes *Brescia*, die das Glykoprotein E2 sowie teilweise zusätzlich andere Strukturproteine des Vakzinestammes CS enthielten (Risatti *et al.*, 2005a). Diese zeigten einen *in vivo* attenuierten Phänotyp, ihre Wachstumseigenschaften in primären Makrophagenzellkulturen waren jedoch gegenüber denen des hochvirulenten Ursprungsvirus nicht verändert. Die Attenuierung ließ sich *in vitro* lediglich an der Bildung kleinerer Plaques festmachen. Eine weitere Mutante von *Brescia*, die eine Insertion im Genomabschnitt des Glykoproteins E1 aufwies, war ebenfalls in ihrer Virulenz im Vergleich zum Wildtypvirus deutlich abgeschwächt, zeigte jedoch ein unverändertes Wachstum in Zellkultur (Risatti *et al.*, 2005b).

In zusammenfassender Betrachtung erscheint fraglich, ob Virulenzunterschiede, insbesondere auch solche im Feld isolierter Viren, über die Erfassung des *in vitro*-Wachstums identifizierbar sind.

### 5.2.1.2. Darstellung der Wachstumskurven in der Ersten Ableitung

Das Wachstum von Bakterien oder auch die Vermehrung von Viren in einer Zellkultur finden in exponentieller Form statt. Theoretisch würde sich in gleich langen Zeitintervallen die Anzahl der Individuen um den gleichen Faktor (proportional zur bereits bestehenden Größe der Kultur) vergrößern, d.h. die Populationsentwicklung verlief geometrisch. Da das Wachstum solcher natürlicher Systeme wie Bakterien- oder Viruskulturen aber von bestimmten äußeren Bedingungen abhängig ist (z.B. zunehmender Nährstoffmangel durch Verbrauch des Mediums), wirkt die steigende Anzahl der Individuen als „Wachstumsbremse“, die Reproduktionsfunktion beschreibt eine Hyperbel, was im so genannten Verhulst-Modell (Verhulst, 1845) ausgedrückt wird.

Die KSPV-Laborstämme vom Genotyp 1.1 zeigten unabhängig von ihrer Virulenz insgesamt eine schnellere und intensivere Vermehrung des zellgebundenen Virus als die Feldisolate vom Genotyp 2.3. Dies unterstützt die auf der Grundlage der Wachstumskinetiken von uns aufgestellte These, nach der ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp des betreffenden Virus und seiner Vermehrung in Zellkultur besteht. Die Reproduktionsfunktion des *C-Stammes* stimmt trotz seiner Attenuierung in engen Grenzen mit denen der übrigen Stämme vom Genotyp 1.1 überein. Am langsamsten und schwächsten vermehrte sich das Feldisolat 2.3 *Spante*. Es wies im Tierexperiment von allen hier untersuchten aktuellen Feldisolaten die geringste Virulenz auf (Kaden *et al.*, 2000c). An dieser Stelle könnte ein Zusammenhang zwischen Vermehrungsintensität und Virulenz vermutet werden, wenn ausschließlich KSPV



desselben Genotyps in die Untersuchung einbezogen wären. Ein ähnlicher virulenzabhängiger Unterschied war allerdings bei den Viren vom Genotyp 1.1 nicht zu beobachten.

### 5.2.2. Expressionskinetik des Glykoproteins E2

Das Glykoprotein E2 ist das hauptimmunogene Protein des KSPV und spielt im Infektionsablauf eine wichtige Rolle. Wahrscheinlich stellt es den ersten Kontakt mit der Zielzelle her (Unger, 1993). Gegen E2 gerichtete mAk neutralisieren die Infektiosität des Virus (Moennig, 1990). Die Inokulierung von E2-exprimierendem Lebendvirus oder gereinigtem E2 ruft eine protektive Immunantwort in Schweinen hervor (van Zijl *et al.*, 1991; Rümenapf *et al.*, 1991a; Rümenapf *et al.*, 1991b; Hulst *et al.*, 1993; van Rijn *et al.*, 1996; Ahrens *et al.*, 2000). Die Aminosäuresequenz des Proteins scheint weiterhin von Bedeutung für die Virusvirulenz zu sein. Der Austausch eines Aminosäurerestes in der Genomregion von E2 führte zusammen mit adaptiven Mutationen in E<sup>ms</sup> zu einer Virulenzreduktion eines Klons des hochvirulenten KSPV-Stammes *Brescia* (van Gennip *et al.*, 2004). Ebenso war zur Attenuierung eines *in vitro* transkribierten infektiösen Klons von *Brescia* der Austausch des E2 gegen das des Vakzinestammes *CS* ausreichend, während durch keinen Austausch einer anderen Genomregion ein ähnlicher Effekt erzielt werden konnte (Risatti *et al.*, 2005a). Dies unterstreicht die Rolle des Proteins in der Virulenzausbildung von KSPV.

Mittelholzer *et al.* (2000) konnten in ihren Untersuchungen zur Expression des Glykoproteins E2 während des KSPV-Verbreitungszyklus, die mittels Western Blot und eines E2-Capture ELISA durchgeführt wurden, keine virulenzspezifischen Unterschiede zwischen den von ihnen eingesetzten Viren feststellen. Um dieses Ergebnis für die hier getesteten KSPV-Stämme und -Isolate zu verifizieren, fanden im Rahmen der Ein-Schritt-Wachstumskinetiken auch Untersuchungen zur E2-Expression statt. Sie wurden ebenfalls mit Hilfe der Western Blot-Technik durchgeführt, gefolgt von der Bestimmung der Anzahl der innerhalb eines bestimmten Zeitraumes vom Bereich der E2-spezifischen Banden auf den Blots ausgesandten Lumineszenzsignale. Das ermöglichte eine genauere Quantifizierung der E2-Menge.

Bereits bei visueller Auswertung der einzelnen Western Blots wurde deutlich, dass die mit KSPV vom Genotyp 1.1 hergestellten eine höhere Signalstärke der einzelnen Banden aufwiesen als diejenigen von Isolaten des Genotypes 2.3. Außerdem gelang bei einem Teil der Laborstämme (Genotyp 1.1) der Erstdnachweis von E2 in Form einer Bande mit 14 h *p.i.* bereits zu einem früheren Probenahmezeitpunkt als bei den Feldisolaten (Genotyp 2.3). Damit lag die Empfindlichkeit der von uns angewandten Western Blot-Technik etwa gleichauf mit der von Mittelholzer *et al.* (2000). Bei letzteren war E2 ab 12 h *p.i.* nachweisbar. Die

Quantifizierung der Lumineszenzintensitäten bestätigte die Unterschiede zwischen den zu den verschiedenen Genotypen gehörenden KSPV. Bei den KSPV vom Genotyp 1.1 waren die prozentualen Intensitäten verglichen mit der Positivkontrolle deutlich höher als bei denen vom Genotyp 2.3. Sie überstiegen den Leerwert der Negativkontrolle bereits ab 14 h *p.i.* Bei den Feldisolaten (Genotyp 2.3) war dies erstmals 24 h *p.i.* bei einem Teil der untersuchten Viren der Fall.

Insgesamt befinden sich die Resultate der E2-Expressionskinetiken mit denen der Ein-Schritt-Wachstumskinetiken im Einklang. Die Laborstämme vom Genotyp 1.1 wiesen höhere zellgebundene Virustiter und folgerichtig höhere E2-Gehalte in der Zellsuspension auf als die Feldisolate vom Genotyp 2.3. Wie bei den Wachstumskinetiken so zeichnete sich auch bei der E2-Expression ein Bezug zum Genotyp des jeweiligen KSPV ab. In Übereinstimmung mit Mittelholzer *et al.* (2000) konnten hingegen keine Unterschiede in Verbindung mit der Virulenz ermittelt werden.

Von künftigem Interesse könnte die Erstellung gleichartiger Kinetiken für E<sup>ms</sup> sein. Dieses Protein induziert, wie das Glykoprotein E2, neutralisierende Ak (Weiland *et al.*, 1992), die Schutz vor einer Challengeinfektion vermitteln und ist somit vermutlich ebenfalls grundsätzlich an den ersten Schritten der Infektion beteiligt. Eine zellkulturadaptierte, avirulente Variante des KSPV-Stammes *Brescia* wies im Vergleich mit einem virulenten Wildtypvirus mehrere Mutationen in der E<sup>ms</sup>-Region auf. Diese trugen zur abgeschwächten Virulenz einer aus beiden Viren generierten Chimäre in infizierten Schweinen bei (van Gennip *et al.*, 2004). Wird weiterhin die RNase-Aktivität von E<sup>ms</sup> durch Mutagenese inhibiert, zeigt das resultierende Virus eine deutlich verminderte Virulenz (Meyers *et al.*, 1999). Klinische Erscheinungen waren bei mit einer Mutante infizierten Schweinen abgeschwächt oder fehlten, und die Depletion der B-Zellen blieb aus. In Experimenten mit anderen Mutanten trat eine initiale Leukozytenreduktion auf, die später, einhergehend mit einer klinischen Erholung der Tiere, wieder verschwand (von Freyburg *et al.*, 2004). Außerdem war die Viruslast im Blut der mit den Mutanten infizierten Tiere wesentlich geringer als bei Infektionen mit Wildtypvirus.

Schließlich übt E<sup>ms</sup> eine zytotoxische Wirkung an Lymphozyten aus und ist damit wahrscheinlich an der mit einer KSPV-Infektion verbundenen Immunsuppression beteiligt (Bruschke *et al.*, 1997).

### 5.2.3. Bestimmung von Plaquegrößen

Die von uns durchgeführten Untersuchungen zur Plaquegrößenbestimmung ließen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen KSPV-Stämmen und –Isolaten erkennen. Die 72 h *p.i.* ermittelten durchschnittlichen Plaquesdurchmesser bewegten sich innerhalb einer bei allen Viren relativ hohen Schwankungsbreite im Bereich des als Referenzvirus herangezogenen Stammes *Alfort 187*, dessen mittlerer Durchmesser auf 100% gesetzt wurde. Resultate anderer Arbeiten sprechen hingegen für einen Zusammenhang zwischen Virulenz und Plaquesdurchmesser. Aynaud (1969) stellte fest, dass der virulente Stamm *Alfort*, ebenso wie eine Reihe von durch fortgesetzte Passagierung bei 29°C aus *Alfort* generierte, virulenzabgeschwächte Klone nach 24 h auf PK-15-Zellen Plaques bildeten, die aus 15 bis 30 Zellen bestanden. Die Plaques des durch Lapinisierung hergestellten, avirulenten Impfstammes *Suvac* bestanden hingegen lediglich aus 1 bis 2 Zellen. Folgeexperimente, die ein anderes hochvirulentes KSPV sowie eine Reihe weiterer Impfstämme umfassten, bestätigten diese Ergebnisse (Aynaud *et al.*, 1972). Der Stamm 331 (Mengeling und Packer, 1969), ein in der Hauptsache chronische Erkrankungen auslösendes KSPV, zeichnete sich ebenfalls durch die Produktion kleiner Plaques aus. Mit Ausnahme dieses Stammes handelte es sich bei allen in den zitierten Versuchen verwendeten schwach- oder avirulenten KSPV wiederum um mit Hilfe von Labormethoden attenuierte Viren und nicht um Feldisolate. Offenbar spielte die Art und Weise der Attenuierung bei der Veränderung der plaquebildenden Eigenschaften eine Rolle. Die auf PK-15-Zellen hergestellten Kältemutanten von *Alfort* produzierten wie das Wildtypvirus weiterhin große Plaques, während die in heterologen Systemen (Kaninchen bzw. heterologe Säugerzellen) attenuierten Vakzinestämme die Bildung kleiner Plaques und ein verglichen mit den virulenten KSPV verzögertes Wachstum zeigten. Im Unterschied zu Aynaud (1969) und Aynaud *et al.* (1972) setzten wir dem EM ein Hyperimmunserum zu, um zellfreies Virus zu neutralisieren und ausschließlich eine direkte Vermehrung von Zelle zu Zelle zu ermöglichen. Während die genannten Autoren ihre Messungen bereits 24 h *p.i.* durchführten, wählten wir den Zeitpunkt 72 h *p.i.*, da dann die exponentielle Phase der Virusvermehrung bereits abgeschlossen ist. Möglicherweise ist der beobachtete Plaquegrößenunterschied einer insgesamt langsameren Vermehrung schwach- oder avirulenter Viren geschuldet und deshalb nur zu einem relativ frühen Zeitpunkt nach der Infektion messbar. 72 h *p.i.* ist die Virusreplikation bereits in eine Plateauphase eingetreten, was evtl. auch mit einer Angleichung ursprünglich voneinander abweichender Plaquesdurchmesser einhergeht. Risatti *et al.* (2005a) registrierten, ebenfalls 72 h *p.i.* eine um ca. 90% reduzierte Plaquegröße bei einem infektiösen Klon des

Vakzinestammes CS gegenüber einem infektiösen Klon des hochvirulenten KSPV-Stammes *Brescia*. Hierbei wurde die Zellkultur allerdings mit Agarose überschichtet und nicht, wie in den hier durchgeführten Versuchen, ein Hyperimmenserumzusatz vorgenommen.

Andere Autoren stellten, wie Aynaud (1969) und Aynaud *et al.* (1972) unter Heranziehung des Zustandes 24 h *p.i.*, bei der Vermehrung eines virulenten KSPV ohnehin fest, dass sich die Größe der Plaques, wie auch in den hier dargestellten Versuchen gefunden, innerhalb eines weiten Spektrums bewegte und deshalb nicht von einer repräsentativen Plaquegröße ausgegangen werden konnte (Danner und Bachmann, 1970). Erklärt wurde dies mit der mit 6 bis 8 h relativ hohen Variabilität der Dauer des viralen Vermehrungszyklus. Im Extremfall kann es dadurch zu einer zeitlich stark verzerrten Plaqueentwicklung kommen.

Um den Effekt der Hyperimmenserumzugabe zu dokumentieren, kultivierten wir ein hoch- und ein schwachvirulentes KSPV (*Eystrup* bzw. *Spante*) mit und ohne den Zusatz des Serums. Während *Eystrup* ohne Serumzusatz 72 h *p.i.* eine große Anzahl von sekundären Plaques und Einzelzellen infiziert hatte, fanden sich beim schwachvirulenten Isolat *Spante* kaum Unterschiede zur Infektion unter Serumzusatz. Das schwachvirulente Virus verbreitete sich offenbar deutlich langsamer in der Zellkultur als das hochvirulente, was wiederum in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen steht (Aynaud, 1969; Aynaud *et al.*, 1972). Da die ausgewählten KSPV jedoch unterschiedlichen Genotypen angehören, lässt sich nicht ohne weiteres beurteilen, ob die beobachteten Effekte mit der Virulenz zusammenhängen oder genetische Ursachen haben. Weitere Experimente mit Viren unterschiedlicher Virulenzgrade von beiden Genotypen sind für eine abschließende Klärung nötig.