

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. *Virus der Klassischen Schweinepest*

#### 2.1.1. Taxonomie

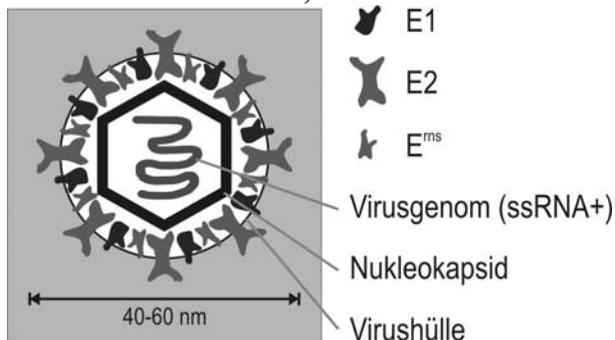
Das Virus der KSP gehört wie das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) und das *Border Disease-Virus* (BDV) der Schafe zum Genus *Pestivirus* innerhalb der Familie der *Flaviviridae* (Wengler, 1991).

Die Familie der *Flaviviridae* beinhaltet außerdem die Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus* mit dem humanen Hepatitis C-Virus. Ersterem werden u.a. das Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis und das Gelbfiebertvirus des Menschen sowie das *Louping Ill-Virus* und das *Wesselsbron Disease-Virus* der Schafe zugeordnet (Wengler, 1995).

#### 2.1.2. Morphologie

Das KSPV (Abb. 1) ist ein behülltes RNA-Virus von sphäroidischer Gestalt. Es hat einen Durchmesser von 40 bis 60 nm (Enzmann und Weiland, 1978; Wengler, 1991). Das 30 nm große ikosaedrische Nukleokapsid wird von einer lipidhaltigen bilaminaren Hülle umschlossen, in die Glykoprotein-Peplomere eingebettet sind (Horzinek *et al.*, 1967; Horzinek *et al.*, 1971; Enzmann und Weiland, 1978).

**Abb. 1:** Virus der KSP, schematische Darstellung



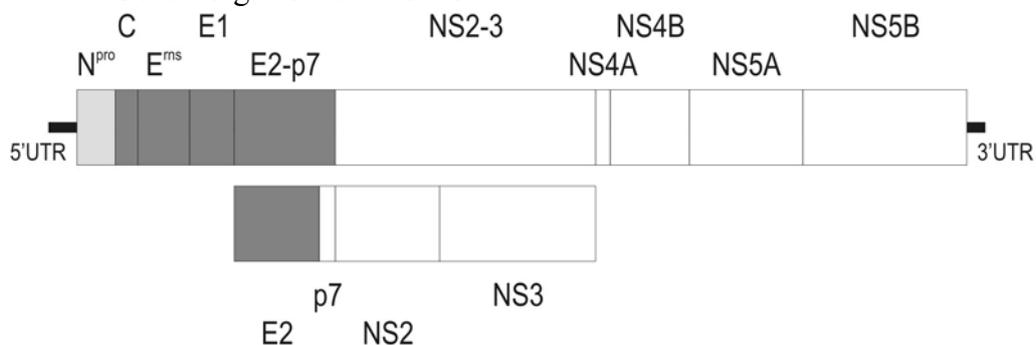
#### 2.1.3. Genom und Genprodukte

Das Genom des KSPV besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität, deren Länge ca. 12,3 Kilobasen (kb) beträgt. Sie kodiert für etwa 4000 Aminosäuren in einem einzigen offenen Leserahmen, der am 5'- und am 3'- Ende von nichttranslatierten Bereichen

begrenzt wird (Meyers *et al.*, 1989). Die Translation beginnt mit der Bindung der Ribosomen, die über eine *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) in der 5' *untranslated region* (UTR) vermittelt wird (Poole *et al.*, 1995; Rijnbrand *et al.*, 1997). Im Translationsverlauf entsteht zunächst ein (hypothetisches) Polyprotein, das ko- und posttranslational in 12 reife Virusproteine prozessiert wird (Meyers und Thiel, 1996); (Abb. 2). Die Prozessierung beginnt mit der Abspaltung der N-terminalen Autoprotease N<sup>pro</sup> vom (folgenden) Polyprotein (Wiskerchen *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1993; Muyldermans *et al.*, 1996). N<sup>pro</sup> wurde als Cystein-Proteinase charakterisiert (Rümenapf *et al.*, 1998). Ihr folgen die Strukturproteine, das Nukleokapsidprotein C (*Core*-Protein) sowie die Glykoproteine der Hülle E<sup>ms</sup>, E1 und E2.

Dem *Core*-Protein werden expressionsregulatorische Eigenschaften zugeschrieben (Liu *et al.*, 1998). Im Unterschied zu den Mitgliedern des Genus Flavivirus erfolgt seine Abspaltung vom Polyprotein bei den Pestiviren, wie bei Hepatitis C-Virus, durch das Enzym Signalpeptid-Peptidase (SPP) (Heimann *et al.*, 2006). Die Inhibition der SPP führt zu einer Reduktion des Anteils neusynthetisierter Virionen.

**Abb. 2:** Genomorganisation des KSPV



Das Glykoprotein E<sup>ms</sup> (gp44/48) ist an der Oberfläche der Virionen lokalisiert (Weiland *et al.*, 1992; Weiland *et al.*, 1999). Es besitzt ein kalkuliertes Molekulargewicht von 25,7 kD und ist als reifes Protein stark N-glykosyliert. Das Molekulargewicht des reifen E<sup>ms</sup> beträgt ca. 48 kD. Da es keinen Membrananker besitzt, sondern lediglich nichtkovalent mit den anderen Glykoproteinen verbunden bleibt, wird es in größeren Mengen in das umgebende Medium sezerniert (Rümenapf *et al.*, 1993). Im Virion formt es disulfidgebundene Homodimere mit einem ungefähren Molekulargewicht von 97 kD (Thiel *et al.*, 1991). Gegen E<sup>ms</sup> gerichtete monoklonale Antikörper (mAk) sind schwach virusneutralisierend (Weiland *et al.*, 1992). Nach Präinkubation mit E<sup>ms</sup> wird die Infektion porziner und boviner Zellen mit KSPV komplett und irreversibel inhibiert (Hulst und Moormann, 1997). Mehrere Regionen der Aminosäuresequenz von E<sup>ms</sup> weisen Homologien zu denen einiger fungaler und pflanzlicher

RNasen auf, was durch den Nachweis einer Ribonukleaseaktivität des Proteins bestätigt wurde (Schneider *et al.*, 1993; Hulst *et al.*, 1994). Monoklonale Antikörper, die das KSPV neutralisieren, führen ebenfalls in hohem Maße zu einer Inhibierung der Ribonukleaseaktivität, was den Schluss nahe legt, dass selbige im viralen Lebenszyklus eine wichtige Rolle spielt (Windisch *et al.*, 1996).

Das Glykoprotein E1 (gp33) besitzt im unmodifizierten Zustand ein Molekulargewicht von 21,8 kD. Es ist ebenfalls N-glykosiliert und verfügt über zwei Transmembrandomänen (Rümenapf *et al.*, 1993). Mit dem im offenen Leserahmen folgenden Haupthüllprotein E2 bildet es disulfidgebundene Heterodimere mit einer Größe von ca. 75 kD (Weiland *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991).

Das theoretische Molekulargewicht des Glykoproteins E2 (gp55) beträgt in unglykosilierter Form 41 kD. Das Protein ist über eine oder mehrere Transmembrandomänen fest mit der Virushülle verbunden (Rümenapf *et al.*, 1991a). Es bildet im Virion neben den Heterodimeren mit E1 auch Homodimere mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kD (Thiel *et al.*, 1991). E2 ist das Hauptimmunogen des KSPV. Mit Hilfe von 13 monoklonalen Antikörpern (mAk) konnten vier antigene Domänen A, B, C und D identifiziert werden (Wensvoort *et al.*, 1989b), wobei A, B und C Epitope für neutralisierende Ak enthalten. Die durch E2 erzeugte Immunantwort ist ausreichend, um das Schwein vor einer späteren Infektion mit einer letalen KSPV-Dosis zu schützen (van Zijl *et al.*, 1991; Hulst *et al.*, 1993). Neueste Untersuchungen zeigen, dass auch die Vakzination mit einem gentechnisch hergestellten Fusionsprotein, das das Epitop des E2-Proteins enthält, eine effektive Immunantwort gegen KSPV erzeugt (Liu *et al.*, 2006).

Das im offenen Leserahmen als nächstes kodierte Genprodukt ist das Protein p7. Über seine Funktion ist wenig bekannt, es scheint für die Produktion infektiöser Virionen, nicht aber für die RNA-Replikation erforderlich zu sein (Harada *et al.*, 2000). Seine Abspaltung vom Glykoprotein E2 ist unvollständig, so dass neben p7 auch ein stabiles E2-p7 existiert. Beide Formen wurden bislang nur zellassoziiert, nicht aber in freien Virionen nachgewiesen (Elbers *et al.*, 1996).

Alle in C-terminaler Richtung nun noch folgenden Proteine sind Nichtstrukturproteine. Das erste ist das NS2-3 mit einer Größe von ca. 125 kD. Das homologe Protein wird in zytopathogenen (cp) BVDV zu einem größeren Teil in zwei einzelne Proteine NS2 und NS3 prozessiert (Collett *et al.*, 1988). Bei der Infektion mit nicht zytopathogenem (ncp) KSPV tritt NS3 nur in sehr geringem Maße auf. Dagegen stellt es in Zellen, die mit cp Virus infiziert sind, häufig die Hauptkomponente dar. Die Funktion des solitären NS2 ist weitgehend

unbekannt. Für NS3 bzw. NS2-3 sind diverse Enzymaktivitäten beschrieben, vor allem eine Serinproteinase-Aktivität, die verantwortlich ist für die proteolytische Prozessierung des eigenen C-Terminus und aller noch folgenden Nichtstrukturproteine (Wiskerchen und Collett, 1991).

Weiter C-terminal sind die Proteine NS4A und NS4B lokalisiert, wobei lediglich für das NS4A bekannt ist, dass es als Co-Faktor für die vorgeschaltete Serinproteinase agiert (Xu *et al.*, 1997).

Die verbleibenden Nichtstrukturproteine NS5A (etwa 58 kD) und NS5B (etwa 75 kD) treten sowohl als reifes Spaltungsprodukt als auch als ungeschnittenes NS5AB auf. Über die Funktion von NS5A ist wenig bekannt. NS5B repräsentiert die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (Meyers *et al.*, 1989). Die N-terminale Domäne des Proteins spielt dabei eine wichtige Rolle für Template-Erkennung und *de novo*-RNA-Synthese (Xiao *et al.*, 2006).

### 2.1.4. Antigenität

Die 3 Spezies des Genus Pestivirus weisen zum einen antigene Unterschiede auf, zum anderen gibt es diverse Kreuzreaktivitäten (Edwards *et al.*, 1988; Wensvoort *et al.*, 1989a; Wensvoort *et al.*, 1989b; Weiland *et al.*, 1992). Die enge serologische Verwandtschaft zwischen KSPV und BVDV ist bereits seit langem bekannt (Darbyshire, 1960). Innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte des vergangenen Jahrhunderts trat die Generierung von mAk zur Differenzierung porciner und ruminanter Pestiviren voneinander sowie von Stämmen und Isolaten innerhalb einer homologen Pestiviruspezies verstärkt in den Vordergrund (Wensvoort *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 1986; Wensvoort *et al.*, 1989b; Greiser-Wilke *et al.*, 1990). Da die meisten Pestiviren nur eine geringe Wirtsspezifität aufweisen und vor allem aus dem Schwein diverse Viruspezies isoliert werden können, ist die Möglichkeit einer genauen Abgrenzung des KSPV gegenüber anderen Pestiviren von besonderer Bedeutung (Paton *et al.*, 1995). Hierbei erwiesen sich insbesondere gegen die Glykoproteine der Hülle E<sup>ms</sup> und E2 gerichtete mAk als speziesspezifisch (Wensvoort *et al.*, 1989a; Greiser-Wilke *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1991; Kosmidou *et al.*, 1995), während mAk gegen das Nichtstrukturprotein NS2-3 häufig gegen innerhalb der Pestiviren konservierte Genomregionen gerichtet sind und deshalb mit heterologen Spezies kreuzreagieren (Peters *et al.*, 1986; Edwards *et al.*, 1988).

Eingang in die routinemäßige Phänotypisierung von KSPV-Isolaten fand vor allem die Charakterisierung mit Hilfe eines Panels von 12 gegen E2 und 11 gegen E<sup>ms</sup> gerichteten mAk, das die Unterscheidung von 21 antigenetisch verschiedenen KSPV-Stämmen und –Isolaten

ermöglicht (Kosmidou *et al.*, 1995). Ein weiterer gegen E2 gerichteter mAk dient speziell der Identifizierung des KSPV-Vakzinestammes C (Kaden, persönliche Mitteilung).

### 2.1.5. Genotypisierung

Mit fortschreitender Entwicklung auf molekularbiologischem Gebiet ergänzte die Technik der *Polymerase chain reaction* (PCR) mit anschließender Analyse der amplifizierten Nukleinsäuresequenz die bisherigen Methoden der Viruscharakterisierung. Sie erlaubt eine bessere und klarere Abgrenzung zwischen den Virusisolaten als die Serologie. Der dabei vorgenommene Vergleich der entsprechenden Sequenz mit der von anderen Viren des Genus auf der Suche nach Verwandtschaftsbeziehungen und Verbreitungswegen prägte den Begriff der „molekularen Epidemiologie“ (Haas, 1997). Dieser Vergleich wird mit Hilfe von Computerprogrammen vorgenommen und führt zur Erstellung von Sequenzbäumen, aus denen der „Verwandtschaftsgrad“ zwischen einzelnen Virusisolaten ablesbar ist.

Dafür wurde zunächst hauptsächlich die innerhalb der verschiedenen Pestiviren hochkonservierte 5'UTR genutzt (Boye *et al.*, 1991). Auf diese Weise gelang die Unterscheidung von KSPV, BVDV und BDV (Hofmann *et al.*, 1994). Die 48 von diesen Autoren getesteten KSPV-Stämme konnten weiterhin in 2 Hauptgruppen, bestehend aus Isolaten von vor bzw. nach 1985 eingeteilt werden. Letztere unterschied außerdem mehrere Subgruppen, die mit der geografischen Herkunft oder dem Datum der ersten Isolierung der jeweiligen Viren korrelierten. Diese Resultate fanden Bestätigung in weiteren Untersuchungen, in deren Rahmen jüngere KSPV-Isolate von Haus- und Wildschweinen aus Deutschland und Österreich analysiert wurden (Greiser-Wilke, 1997).

Ein Vergleich von Sequenzdaten aus der E2- und der NS5B-Region mit solchen aus der 5'UTR ergab, dass durch die Analyse der E2-Region eine weitergehende Unterscheidung zwischen den getesteten Viren vorgenommen werden kann (Lowings *et al.*, 1996). Der N-Terminus des für das E2-Protein kodierenden Bereiches stellt eine hochvariable Region der Pestivirus-RNA dar und ermöglicht deshalb eine feinere Trennung zwischen einzelnen KSPV-Isolaten. Letztlich bestätigte sich auch hier die Einteilung in 2 Gruppen, wobei alle vor 1970 isolierten Viren der Gruppe 1 und alle jüngeren Isolate der Gruppe 2 angehörten. In Gruppe 1 wurden 2, in Gruppe 2 hingegen 3 Untergruppen gebildet. Die Untersuchung weiterer KSPV aus verschiedenen Teilen der Welt führte zur Bildung einer zusätzlichen Gruppe 3 aus asiatischen Isolaten mit 4 Untergruppen 3.1-3.4 (Paton *et al.*, 2000).

Die im Verlauf der KSP-Ausbrüche in Deutschland während der 1990er Jahre isolierten KSPV gehörten nach Nukleotidsequenzen von 5'UTR und E2 der Gruppe 2 an und

unterschieden sich hiermit deutlich von den älteren Referenzstämmen in Gruppe 1 (Wonnemann *et al.*, 2001). Innerhalb der Gruppe 2 konnten 3 Untergruppen 2.1, 2.2 und 2.3 unterschieden werden, wobei Untergruppe 2.3 nach der geografischen Herkunft wiederum 5 Virustypen (Uelzen, Spreda, Rostock, Güstrow und Spante) in sich vereinigte. Auch hier erlaubte die Analyse der E2-Region eine feinere Unterscheidung zwischen einzelnen Isolaten, jedoch innerhalb der Untergruppe 2.3 lediglich die Darstellung von 2 verschiedenen Virustypen nach ihrem Vorkommen im Osten Deutschlands bzw. in Niedersachsen.

Unter Verwendung anderer Abschnitte des E2- und des Polymerase-Gens entstand eine weitere, differente Einteilung der KSPV in 2 Gruppen, wobei die Gruppe I, repräsentiert durch den Stamm *Brescia*, alte und jüngere amerikanische und asiatische Isolate sowie einige englische Isolate aus den 1950er Jahren enthielt (Vilcek *et al.*, 1996). Sie wurde in 3 Subgruppen I.A-I.C unterteilt. Die Gruppe II, repräsentiert durch den Stamm *Alfort*, vereinigte die Isolate jüngeren Datums aus Europa und bestand aus 2 Subgruppen II.A und II.B. Alle 10 untersuchten Vakzinestämme gruppierten in Gruppe I, was für einen gemeinsamen Ursprung dieser Stämme sprach. Die gleiche phylogenetische Einteilung ergab sich beim Vergleich der 3'UTR von 27 KSPV-Isolaten und 3 Vakzinestämmen (Vilcek und Belak, 1997).

### **2.2. *Verlaufsformen und Pathologie der Erkrankung***

Die Krankheit kann innerhalb einer großen Variationsbreite von Symptomen perakut, als akute Allgemeinerkrankung, chronisch oder klinisch inapparent verlaufen. Generell werden nach dem Infektionszeitpunkt post- und prenatale Infektionen unterschieden (Cheville und Mengeling, 1969; Dunne, 1970; van Oirschot und Terpstra, 1977b). Die perakute Form wird heutzutage nahezu nicht mehr beobachtet, vielmehr bestimmen sowohl beim Haus- als auch und vor allem beim Wildschwein mildere, protrahierte oder auch klinisch inapparente Verläufe das Krankheitsgeschehen (Aynaud *et al.*, 1976; Moennig und Plagemann, 1992; Haas, 1997; Depner *et al.*, 1997c; Kaden *et al.*, 1999b; Kaden *et al.*, 2004). Nachfolgend werden Verlaufsformen und Pathogenese der Erkrankung hauptsächlich auf der Grundlage am Hausschwein gewonnener Erkenntnisse beschrieben.

### 2.2.1. Postnatale Infektion

#### 2.2.1.1. Perakute, akute und subakute Verlaufsform

Der perakute Verlauf ist durch eine hohe Morbidität gekennzeichnet und führt innerhalb von 5 Tagen (*d post infectionem (p.i.)*) zum Tod der betroffenen Tiere (Dunne, 1970). Typische klinische Erscheinungen, die den Verdacht auf Schweinepest nahe legen könnten, treten nicht auf (Fuchs, 1968).

Die akute Infektion kann transient oder primär letal verlaufen. Ist letzteres der Fall, so tritt der Tod zwischen dem 10. und 20. *d p.i.* ein. Innerhalb der ersten 2 bis 6 Tage nach Virusexposition steigt die Körpertemperatur auf über 40°C an. Neben Apathie und Anorexie können Konjunktivitiden mit Augen- und Nasenausfluss, geschwollene Lymphknoten, respiratorische Erscheinungen (Dyspnoe, Husten), Durchfall, mitunter abwechselnd mit Verstopfung, Erbrechen und zentralnervöse Ausfallserscheinungen in unterschiedlichem Maße das Krankheitsbild bestimmen. Letztere reichen von Ataxie, Koordinationsstörungen und Nachhandschwächen bis zur kompletten Lähmung der Hintergliedmaße und zu Krampfanfällen. Veränderungen der Haut sind gekennzeichnet durch das Auftreten petechialer oder auch großflächigerer Blutungen und zyanotischer Areale, die im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auch nekrotisch werden können (Dunne, 1970; Depner *et al.*, 1994; Depner *et al.*, 1996; Laevens *et al.*, 1999). Eine Virämie besteht während der gesamten Dauer der Erkrankung, und das Virus wird über die Schleimhäute, Harn und Kot ausgeschieden (Depner *et al.*, 1994; Laevens *et al.*, 1999). Überleben die betroffenen Tiere einen Zeitraum von bis zu 29 *d p.i.*, so spricht man von einem subakuten Verlauf (Dunne, 1970).

Neutralisierende Antikörper (Ak) werden bei Tieren, die an der Infektion verenden, gewöhnlich nicht oder nur in geringen Mengen ab ca. 2 bis 3 Wochen *p.i.* nachgewiesen.

Beim transienten Verlauf sind die KSP-spezifischen Symptome in der Regel weniger schwerwiegend oder können gänzlich fehlen. Ab der 2. bis 3. Woche *p.i.* steigen die Ak-Titer kontinuierlich an und erreichen ihre Höchstwerte nach 3 bis 4 Monaten (Ressang, 1973a; Depner *et al.*, 1994; Depner *et al.*, 1996; Laevens *et al.*, 1998).

Die charakteristischen pathomorphologischen Veränderungen der akuten KSP beschreiben das Bild der hämorrhagischen Diathese mit petechialen Blutungen in zahlreichen Organen (Fuchs, 1968; Trautwein, 1988). Beim perakut verendeten Tier hingegen zeigt sich häufig lediglich eine allgemeine Schocksymptomatik ohne Anzeichen von Hämorrhagien (Trautwein, 1988). Im akuten Erkrankungsfall sind die Lymphknoten meist ödematisiert und

blutig infiltriert. Die Tonsillen zeigen zunächst eine leichte, in späteren Stadien eine nekrotische oder bei bakterieller Beteiligung eine suppurative Entzündung. Die bereits beschriebenen petechialen Blutungen finden sich vor allem auf Nieren, Harnblase, Kehldeckel, Larynx und Herzmuskel sowie auf den serösen Häuten von Brust- und Bauchhöhle. Im Intestinaltrakt können sich entzündliche Prozesse unterschiedlicher Stadien manifestieren. Ein typisches Zeichen sind die so genannten *button ulcers* im Kolon. Weiterhin gilt das Auftreten von Milzrandinfarkten als pathognomonisch für die KSP (Röhler, 1953; Dunne, 1970; Trautwein, 1988; Dahle und Liess, 1992). Histopathologisch wird häufig eine nichteitrige Enzephalitis diagnostiziert (Röhler, 1953; Gruber *et al.*, 1995).

### 2.2.1.2. Chronische Verlaufsform

Die chronische Form der KSP ist definiert als letale Erkrankung mit einer Dauer von mehr als 30 Tagen (Mengeling und Cheville, 1968). Im klassischen Fall können 3 Phasen des Verlaufes unterschieden werden (Mengeling und Packer, 1969): Die erste Phase ist gekennzeichnet durch deutliche Krankheitsanzeichen, Fieber und Leukopenie. In einem Zeitraum von 3 bis 6 Wochen *p.i.* kommt es zu einer Besserung des klinischen Zustandes, allerdings persistiert die Leukopenie in den meisten Fällen. In dieser zweiten Phase können mitunter vorübergehend neutralisierende Ak gegen KSPV detektiert werden, während für kurze Zeit kein Virus im Serum nachweisbar ist. Davon abgesehen bestehen Virämie und Virusausscheidung über den gesamten Erkrankungszeitraum, weswegen chronisch infizierte Tiere eine nicht unbedeutende Rolle in der Virusverbreitung bei Infektionen im Feld spielen können (Depner *et al.*, 1996). In der dritten und terminalen Erkrankungsphase flammen die klinischen Symptome erneut auf und bedingen nach einer Gesamtdauer von durchschnittlich 2 bis 3 Monaten (Moennig *et al.*, 2003) schließlich den Tod der betroffenen Tiere. In einem Experiment, das die Charakterisierung von 135 Feldisolaten durch deren Inokulation in Absatzferkel umfasste, induzierten 8 der Viren persistierende Infektionen mit einer Dauer von bis zu 152 Tagen (Carbrey *et al.*, 1980). Häufig führen bakterielle Sekundärinfektionen zu einem uncharakteristischen Krankheitsbild und damit zu Fehldiagnosen. Die chronische KSP wird deshalb mitunter auch als „atypische Schweinepest“ bezeichnet (Fuchs, 1968).

Pathomorphologisch sind die Anzeichen für eine KSP-Infektion in Form von Hämorrhagien häufig nicht oder nur in geringem Maße vorhanden. Häufig ist ein bestimmtes Organsystem besonders betroffen und durch die oben beschriebenen Sekundärinfektionen auch untypisch verändert. Im Kolon sind gelegentlich *button ulcers* anzutreffen, die in fortgeschrittenen Stadien von einer diffusen diphtheroid-nekrotisierenden Enteritis abgelöst werden. Die

Lymphknoten zeigen häufig lediglich eine Hyperplasie, und die typischen hämorrhagischen Veränderungen fehlen (Trautwein, 1988).

### 2.2.2. Pränatale Infektion

Der größte Anteil chronisch verlaufender KSPV-Infektionen kommt durch eine kongenitale Infektion des Fetus *in utero* zustande (Dahle und Liess, 1992). Der Begriff „Carrier-Sau“ (Huck und Aston, 1964) bezeichnet hierbei die meist mit einem Virus abgeschwächter Virulenz infizierte, tragende Muttersau, die selbst keine klinische Symptomatik entwickelt, das Virus jedoch diaplazentar auf die Früchte überträgt. Die Auswirkungen der Infektion hängen dabei wesentlich vom Gestationszeitpunkt ab, zu dem sie erfolgt. 3 typische Formen der pränatalen Infektion können unterschieden werden (Liess, 1984): (i) In einem frühen Stadium der Trächtigkeit (bis zum 41. Tag) kommt es in der Regel zum Abort oder zur Totgeburt der Ferkel. (ii) Erfolgt der Viruskontakt später (vor dem 85. Trächtigkeitstag), so wird ein Teil der Ferkel mit einer kongenitalen persistierenden Virämie geboren. Diese Tiere scheiden bis zu ihrem Tod ständig Virus aus. (iii) Etwa ab dem 85. Trächtigkeitstag ist das Immunsystem soweit entwickelt, dass der Fetus eine Infektion abwehren kann (van Oirschot, 1979a; Frey *et al.*, 1980). Diese Gruppe von Ferkeln ist zum Geburtszeitpunkt nicht infiziert. Die Tiere bleiben gesund und bilden nach dem Verschwinden maternaler Ak gegen das KSPV neutralisierende Ak aus, wenn sie mit infizierten Wurfgeschwistern zusammenleben. Totgeborene/mumifizierte Früchte können zusammen mit virämischen und gesunden Ferkeln im selben Wurf vorkommen. Die Inokulation von Virus in tragende Sauen jenseits des 85. Trächtigkeitstages führte in mehreren Versuchsansätzen zur Geburt gesunder, nichtvirämischer Ferkel (van Oirschot, 1979a; Frey *et al.*, 1980; Meyer *et al.*, 1981). Persistierende Infektionen mit einer maximalen Überlebensdauer von 65 *d p.i.* konnten jedoch andererseits auch induziert werden, wenn die Exposition eines schwachvirulenten Virus (Stamm *Glentorf*) in den letzten Trächtigkeitstagen bzw. unmittelbar nach der Geburt erfolgte. Dies ist vermutlich vergleichbar mit der chronischen Form der KSP nach postnataler Infektion (Ehrensperger, 1988).

Virämisch geborene Ferkel zeigen in den ersten Lebenswochen bis –monaten keinerlei Krankheitsanzeichen und sind somit von gesunden Wurfgeschwistern nicht zu unterscheiden (van Oirschot und Terpstra, 1977b; Meyer, 1978; Meyer *et al.*, 1981). Dies macht sie zu gefährlichen, weil unerkannten Verbreitern von Virus im Bestand. Nach dieser augenscheinlich gesunden Phase entwickeln die Tiere Tage bis Wochen vor ihrem Tod Krankheitssymptome, verbunden mit einem Abfall der Leukozytenzahlen auf unter

10000/mm<sup>3</sup>. Für diesen typischen Verlauf wurde der Begriff *late onset syndrome* geprägt (van Oirschot und Terpstra, 1977b). In der Sektion zeigen solche Tiere in der Regel keine für die KSP charakteristischen Symptome, doch wird meist eine schwere Thymusatrophie beobachtet. KSP-Antigen lässt sich aus praktisch allen lymphoidalen, retikulo-endothelialen und epithelialen Geweben isolieren. Obgleich die Tiere keine humorale Immunantwort auf das KSPV zeigen, ist ihre Reaktivität gegenüber nichtverwandten Antigenen im Vergleich zu Kontrolltieren nicht eingeschränkt. Es handelt sich also um eine KSP-spezifische Immuntoleranz, womit sich die pränatale persistierende Infektion deutlich von der oben beschriebenen postnatalen chronischen Infektion unterscheidet (van Oirschot und Terpstra, 1977a; van Oirschot, 1979b).

### **2.3. Pathogenese und Immunologie der Erkrankung**

#### **2.3.1. Pathogenese**

Die natürliche Infektion mit dem Virus der KSP erfolgt auf oronasalem Wege (Ressang, 1973b). Das primäre Zielorgan ist die Tonsille, wo eine erste Replikation stattfindet und das Virus 7 h nach erfolgter Infektion nachweisbar ist (Dunne *et al.*, 1959). Es infiziert vor allem Epithelzellen auf der Oberfläche und in den Krypten der Tonsillen. Von hier aus erfolgt die weitere Verbreitung über Lymphgefäße zu den regionären Lymphknoten und danach über das Blut zu den primären Zielorganen (Milz, Knochenmark, viszerale Lymphknoten, Lymphfollikel und Peyersche Platten in der Mukosa des Dünndarmes). Die initiale Virämie tritt 16 bis 24 h nach erfolgter Infektion auf (Dunne *et al.*, 1959; Ressang, 1973a, b). Nach einer weiteren Vermehrungsphase in den primären Zielorganen und den Blutleukozyten werden schließlich auch parenchymatöse Organe befallen. Generell bleibt der Virustiter in den Lymphgeweben dabei höher als in den parenchymatösen Organen. In der Regel ist die Verbreitung des Virus im gesamten Organismus nach 5 bis 6 Tagen abgeschlossen (Ressang, 1973a, b).

#### **2.3.2. Immunologische Veränderungen**

Die Infektion mit KSPV beeinflusst und schädigt das Immunsystem in vielfältiger Weise. Das Virus weist einen besonderen Tropismus zu Immunzellen auf. Charakteristisch ist das Auftreten einer Leukopenie bereits vor Beginn der Fieberphase (Dunne, 1973). Pathohistologisch kann in den Organen des lymphatischen Systems (Thymus, Lymphknoten,

Milz, Tonsillen und darmassoziiertes Lymphgewebe) eine Lymphozytendepletion und eine Proliferation der Histiocyten festgestellt werden (Trautwein, 1988). Die vor allem bei chronischen Krankheitsverläufen zu verzeichnende Atrophie des Thymus (Cheville und Mengeling, 1969; van der Molen und van Oirschot, 1981; Sato *et al.*, 2000) hat eine progressive Apoptose der Thymozyten zur Ursache (Pauly *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000; Sanchez-Cordon *et al.*, 2002). Innerhalb der sich im Verlauf der Erkrankung immer stärker manifestierenden Lymphopenie (Ressang, 1973a; Gisler *et al.*, 1999) ist besonders die Depletion der B-Zellen bemerkenswert (Susa *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1999), wengleich nicht immer signifikante Unterschiede im Grad der Depletion von T- und B-Lymphozyten auftreten (Summerfield *et al.*, 1998b).

Als Ursache für die frühzeitige und weit reichende Zerstörung insbesondere lymphozytärer Zellen wurde neben einem direkten zytotoxischen Effekt des KSPV die erhöhte Freisetzung von Glukokortikosteroiden aus der hyperplastischen Nebennierenrinde diskutiert (van der Molen und van Oirschot, 1981). Nach neueren Erkenntnissen spielen eher apoptotische Vorgänge eine Rolle, die weniger durch eine KSPV-Infektion der Lymphozyten oder Thymozyten selbst als vielmehr durch indirekte Wechselwirkungen mit anderen (infizierten) Zellen des Immunsystems hervorgerufen werden sollen (Summerfield *et al.*, 1998b; Sato *et al.*, 2000; Sanchez-Cordon *et al.*, 2002). Dies wird vor allem deshalb vermutet, weil Funktionsstörungen und Depletion der lymphozytären Zellen bereits zu Beginn der Infektion präsent sind, lange bevor virusinfizierte Lymphozyten detektiert werden können (Pauly *et al.*, 1998; Summerfield *et al.*, 1998b; Gisler *et al.*, 1999; Summerfield *et al.*, 2001). Myeloide Zellen (Monozyten und Granulozyten) stellen die Haupttargetzellen des KSPV im peripheren Blut dar, sind jedoch in weitaus geringerem Maße von Verlusten betroffen als die Lymphozyten (Summerfield *et al.*, 1998a; Sato *et al.*, 2000; Gomez-Villamandos *et al.*, 2001). Auf Grund der Lymphozytendepletion kommt es im Rahmen der KSPV-Infektion deshalb zu einem relativen Anstieg der Anzahl myeloider Zellen (Summerfield *et al.*, 1998a). Die Infektion von Monozyten und Makrophagen führt u.a. zur verstärkten Produktion verschiedener Zytokine und Entzündungsmediatoren. Dies konnte zum einen in Zusammenhang gebracht werden mit einer Modulation der Lymphozytenproliferation und –aktivierung, die vermutlich die Apoptose dieser Zellen nach sich zieht (Summerfield *et al.*, 1998a; Summerfield *et al.*, 1998b; Sanchez-Cordon *et al.*, 2002). Zum anderen liegt hier eine mögliche Ursache für das Auftreten von Fieber und den KSP-typischen Koagulationsstörungen (Knoetig *et al.*, 1999). Monozytäre Zellen spielen demzufolge vermutlich eine tragende Rolle sowohl bei der Entstehung der Lymphopenie als auch für die

Pathogenese der KSP insgesamt. Eine erhöhte Produktion inflammatorischer Zytokine wurde außerdem in virusinfizierten Endothelzellen nachgewiesen, die dadurch vermutlich ebenfalls zur immunsuppressiven Wirkung der KSPV-Infektion beitragen und außerdem über die Attraktion monozytärer Zellen die Verbreitung des Virus im Organismus erleichtern (Bensaude *et al.*, 2004).

Weiterhin liegen Untersuchungen vor, die dem Hüllglykoprotein E<sup>ms</sup>, das von KSPV-infizierten Zellen sezerniert wird, eine immunsuppressive Wirkung zuschreiben (Bruschke *et al.*, 1997). *In vitro* führte die Zugabe von E<sup>ms</sup> zu einer starken Inhibierung der Concanavalin A-induzierten Proliferation und der Proteinsynthese von Lymphozyten und dadurch zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen. Allerdings übten Seren infizierter Tiere bzw. Überstände infizierter Zellkulturen auf Lymphozyten nicht infizierter Tiere keinen schädigenden Effekt aus (Summerfield *et al.*, 1998b).

### **2.4. Faktoren, die den Erkrankungsverlauf beeinflussen**

Das außerordentlich variable klinische Bild der KSP unterliegt dem Einfluss einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren. Vor allem das Zusammenspiel sowohl virus- als auch wirtsseitiger Parameter entscheidet dabei über Entstehung und Verlauf der Infektion (van Oirschot, 1988).

#### **2.4.1. Einflussfaktoren von Seiten des Wirtes**

Wirtsseitige Einflüsse auf den Erkrankungsverlauf kommen besonders zum Tragen bei der Infektion mit Viren reduzierter Virulenz (Mengeling und Cheville, 1968; Liess *et al.*, 1976). So induzierte ein über Kaninchenpassagen abgeschwächtes KSPV chronisch-persistierende Infektionen in 6 Wochen alten Ferkeln, während 3 Monate alte Tiere nicht erkrankten (Baker und Sheffy, 1960). Das Alter des infizierten Tieres stellt einen der wohl wichtigsten wirtsseitigen Faktoren dar. Saug- und Absatzferkel sind von einer Infektion in der Regel schwerer betroffen als Mastschweine (Carbrey *et al.*, 1966; Pittler *et al.*, 1968; Plateau *et al.*, 1980; van Oirschot, 1988; Depner *et al.*, 1997c; Moennig *et al.*, 2003). Vermutlich spielen die Reife des Immunsystems und die Empfindlichkeit der Makrophagen dabei eine Rolle (van Oirschot, 1988). Während eines großflächigen KSP-Ausbruches in einem Gebiet mit hoher Schweinedichte wurde hingegen beobachtet, dass in der Gruppe der Mastschweine mit einem Körpergewicht von mehr als 20 kg Morbidität und Mortalität offenbar mit zunehmendem Alter anstiegen (Koenen *et al.*, 1996).

Ebenso hängt der Verlauf einer diaplazentaren Infektion wesentlich vom Trächtigkeitsstadium und damit vom Entwicklungsstadium des Fetus ab (s. 2.2.2. ).

Bedeutsam sind weiterhin die Immunkompetenz sowie die Reaktivität des Immunsystems des betroffenen Tieres (van Oirschot, 1988; Dahle und Liess, 1995; Depner *et al.*, 1996; Depner *et al.*, 1997a; Moennig *et al.*, 2003). Häufig werden diese Parameter im Zusammenhang mit der genetischen Konstitution (Rasse) gesehen. In Infektionsversuchen mit halothanresistenten und halothansensitiven Absatzferkeln (Deutsche Landrasse sowie Deutsche Landrasse × Pietrain) erkrankten z.B. die resistenten Schweine tendenziell schwerer als die Gruppe der halothansensitiven Kreuzungstiere (Depner *et al.*, 1997a). In einem anderen Infektionsexperiment konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht bestätigt werden. Die Krankheitsverläufe von Reinzucht- und Kreuzungstieren ließen keine wesentlichen Unterschiede erkennen (Bunzenthal, 2003). Es wurde konstatiert, dass Alter und andere immunmodulierende Einflüsse möglicherweise eine größere Rolle spielen als Faktoren, die in Rasseunterschieden begründet liegen. Weiterhin entwickelten SPF-Tiere bei Infektion unter vergleichbaren Bedingungen eine leichtere Erkrankungsform als Nicht-SPF-Tiere (Mittelholzer *et al.*, 2000). Schließlich kann auch eine Belastung mit Sekundärerregern Einfluss auf den Immunstatus nehmen und so zu schwerwiegenden KSP-Verläufen trotz einer Infektion mit moderat- oder schwachvirulenten KSPV führen (Kaden *et al.*, 1997; Kaden *et al.*, 1999b; Kaden *et al.*, 2004).

Offenbar neigen außerdem im Gegensatz zu den Verhältnissen bei anderen Infektionskrankheiten bei der KSP unzureichend ernährte Tiere eher zu chronischen als zu akuten Krankheitsverläufen (Schmidt *et al.*, 1965).

### **2.4.2. Einflussfaktoren von Seiten des Virus**

#### **2.4.2.1. Allgemeiner Überblick**

Neben der Virulenz gelten die Höhe der Virusdosis, der Infektionsmodus sowie Herkunft und Reinheitsgrad des betreffenden Virusisolates als wichtige vom Virus abhängige Einflussgrößen (Dahle und Liess, 1995). So wurde ein Zusammenhang zwischen der Zeitdauer bis zum initialen Anstieg der Körpertemperatur bzw. dem Einsetzen der Leukopenie sowie dem Gesamtverlauf und Ausgang einer KSPV-Infektion und der Höhe der eingesetzten Virusdosis verzeichnet (Brugh *et al.*, 1964; Liess, 1987; Dahle und Liess, 1995). Bereits in früheren Untersuchungen konnten durch Gabe minimaler Dosen von vollvirulentem KSPV chronische Krankheitsbilder hervorgerufen werden (Köbe und Schmidt, 1934; Dunne

*et al.*, 1955). Die Verabreichung hoher Dosen des moderatvirulenten KSPV-Stammes *NSW* induzierte akute, letal verlaufende Erkrankungen (Kamolsiriprichaiporn *et al.*, 1992). Andere Autoren wiederum stellten lediglich eine untergeordnete Bedeutung der verabreichten Dosis (Korn und Zoeth, 1971; Mittelholzer *et al.*, 2000) und auch der Infektionsroute fest, vielmehr waren die Unterschiede im Infektionsverlauf in den betreffenden Tierexperimenten hauptsächlich auf wirtsspezifische Faktoren zurückzuführen (Depner *et al.*, 1996; Depner *et al.*, 1997c).

Auf den Faktor der Virulenz, dessen Charakterisierung bei verschiedenen KSPV-Feldisolaten das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, soll im Folgenden besonders eingegangen werden.

### 2.4.2.2. Virulenzspektrum

Die Virulenz eines Virus gibt an, wie hoch dessen Fähigkeit zur Krankheitsinduktion in einem empfänglichen Wirt ist (van Oirschot, 1988). Die Virulenz der KSPV-Stämme variiert innerhalb eines sehr großen kontinuierlichen Spektrums. Daher ist es schwierig, ein Virus eindeutig einer bestimmten Virulenzklasse zuzuordnen. Van Oirschot schlug die folgende Einteilung vor: Hochvirulente Stämme führen bei einer Infektion den Tod aller Schweine unabhängig vom Alter herbei. Moderatvirulente Viren induzieren generell subakute oder chronische Erkrankungen, die tödlich oder mit der Genesung des Wirtes enden können. Schwachvirulente Erreger bedingen bei postnataler Infektion nur geringgradige (ggr.) oder keine Symptome, die infizierten Tiere genesen und bilden eine Immunität aus. In Feten kann die Infektion zu Missbildungen führen. Avirulente Stämme sind in der Regel attenuiert und somit apathogen (van Oirschot, 1988). Diese Klassifizierung stieß in der Folgezeit auf Kritik, da sie allein von Seiten des Virus erfolgt und keine die infizierten Tiere betreffenden Standards definiert wurden (Dahle und Liess, 1995; Depner *et al.*, 1996). Hinsichtlich des starken Einflusses, den Wirtsfaktoren auf das Auftreten und den Verlauf einer KSPV-Erkrankung ausüben können, erscheint die Virulenz als relative Größe, die lediglich auf eine bestimmte Kategorie von Tieren anwendbar ist (Depner *et al.*, 1996).

### 2.4.2.3. Virulenzfaktoren und Charakterisierung der Virulenz

Welche Eigenschaften oder genetischen Determinanten die Virulenz eines Virus bestimmen, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Die Virulenz eines KSPV scheint eine eher instabile Eigenschaft zu sein, deren Ausprägung äußeren Einflüssen unterliegt (Korn, 1965; van Oirschot, 1988). Über eine Steigerung der Virulenz nach Tierpassagen wurde wiederholt

berichtet (Baker und Sheffy, 1960; Fuchs, 1968; Dunne, 1970). Demgegenüber treten in enzootisch verseuchten Gebieten verstärkt Viren reduzierter Virulenz auf, die das Auftreten chronischer oder klinisch inapparenter Krankheitsbilder bedingen. Als Ursache für deren Entstehung wird die Replikation des Virus unter dem Druck der Präsenz von Ak vermutet. Dies könnte die Selektion von Virusnachkommen begünstigen, die sich in ihren antigenen Eigenschaften vom Ursprungsvirus unterscheiden oder neutralisationsresistenter sind (Mengeling und Packer, 1969). Dafür sprechen auch Ergebnisse, nach denen während der Rekonvaleszenzperiode aus einem akut-transient infizierten Tier isoliertes KSPV nur schwachvirulente Eigenschaften aufwies, während solches, das zum Höhepunkt der Leukopenie- und Virämieperiode entnommen wurde, bei damit infizierten Tieren eine akute Erkrankung auslöste (Korn, 1965). Schließlich sind die während der letzten Jahrzehnte isolierten KSPV hinsichtlich des durch sie verursachten Krankheitsbildes verglichen mit älteren Isolaten insgesamt geringer virulent (Carbrey *et al.*, 1980; Kaden *et al.*, 1999b; Floegel-Niesmann *et al.*, 2003; Kaden *et al.*, 2004). Beispielsweise waren auf Kuba isolierte KSPV aus einer aktuellen Endemie mit solchen aus einige Jahre zurückliegenden Ausbrüchen eng verwandt, zeigten jedoch Genomveränderungen, die offenbar mit einer Entwicklung in Richtung eines mildereren, eher chronischen Krankheitsgeschehens einhergingen (de Arce *et al.*, 2005).

Möglicherweise erhalten KSPV reduzierter Virulenz größere Chancen zu ihrer Verbreitung, da Infektionen mit selbigen im Feld schwieriger zu ermitteln und damit zu bekämpfen sind (van Oirschot, 1988).

Als beste Methode zur Charakterisierung der Virulenz eines KSPV-Stammes oder –Isolates gilt die experimentelle Infektion von Schweinen unter standardisierten Bedingungen (van Oirschot, 1988). Durch die schematisierte Erfassung und Bewertung von Körpertemperaturen und klinischen Parametern (Wood *et al.*, 1988; Mittelholzer *et al.*, 2000) bzw. zusätzlich pathologischen Parametern (Floegel-Niesmann *et al.*, 2003; Bunzenthal, 2003) erfolgt die Einordnung des Virus in eine Virulenzklasse. Laut Bunzenthal *et al.*, 2003 ermöglicht allein die Erfassung pathologischer Veränderungen nicht die Bewertung der Virulenz eines KSPV, sondern gibt lediglich Hinweise darauf, welche Organveränderungen bei welchen Virusisolaten am häufigsten auftreten. In jedem Falle ist eine Standardisierung von Tiermaterial und Versuchsbedingungen auf Grund des starken Einflusses von wirts- und auch virusseitigen Faktoren von großer Wichtigkeit.

Logistische (experimenteller Aufwand, Kosten) und natürlich vor allem ethische Gründe sprechen für die Vermeidung von Tierexperimenten. Deshalb wurden und werden die

Eigenschaften von KSPV *in vitro* analysiert auf der Suche nach Zusammenhängen mit der *in vivo* gezeigten Virulenz. Besonderes Augenmerk lag dabei zunächst auf der Vermehrung des Virus in Zellkultur sowie seinen physikalischen Eigenschaften. Von der Ausprägung von Merkmalen, wie der Geschwindigkeit und Intensität der Vermehrung oder der optimalen Wachstumstemperatur wurden von einigen Autoren Rückschlüsse auf die Virulenz des jeweiligen KSPV gezogen (Aynaud, 1969; Aynaud *et al.*, 1972). So zeichneten sich hochvirulente KSPV-Stämme durch die Produktion großer, im Immunfluoreszenztest stark fluoreszierender Plaques in PK-15-Zellkulturen und Maximaltitern um  $10^7$  KID<sub>50</sub>/ml aus. Ihre optimale Vermehrungstemperatur lag mit 39°C bis 40°C im Bereich der physiologischen Körpertemperatur des Schweins. KSPV reduzierter Virulenz vermehrten sich optimal im Bereich von 35°C bis 38°C. Vollständig attenuierte Viren bevorzugten abhängig vom Stamm Temperaturen zwischen 33°C und 38°C. Schwach- oder avirulente KSPV replizierten in der Regel langsamer und zu geringeren Maximaltitern (um  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml) als die hochvirulenten Vertreter und bildeten kleinere, schwächer fluoreszierende Plaques als diese. Auf Grund des verursachten klinischen Krankheitsbildes als moderatvirulent eingestufte Stämme nahmen auch im Hinblick auf die *in vitro* untersuchten Eigenschaften eine Mittelstellung ein, weswegen ein Zusammenhang zwischen der Virulenz und dem Verhalten *in vitro* postuliert wurde (Aynaud, 1969; Aynaud *et al.*, 1972).

Im Hinblick auf die Größe der gebildeten Plaques ergab sich in anderen Untersuchungen eine sehr starke Streuung, die die Bestimmung einer „repräsentativen“ Plaquegröße für das entsprechende Virus ausschloss (Danner und Bachmann, 1970).

In einer weiteren Arbeit zeichnete sich ein durch Dauerpassagen auf Kulturzellen modifiziertes KSPV im Gegensatz zu einem virulenten Feldisolat durch die Fähigkeit zur Vermehrung bei 22°C aus (Kubin, 1967). Dies bestätigte die Adaptation attenuierter Viren an niedrigere Temperaturen. Vermutlich wird die Vermehrung attenuierter Viren *in vivo* durch die relativ hohe Körpertemperatur des Schweines begrenzt (Mahnel und Mayr, 1974).

Zu den Replikationseigenschaften unterschiedlich virulenter KSPV in diversen Zellkultursystemen sind die Angaben mitunter widersprüchlich. Verschiedene Autoren stellten eine langsame und schwache Vermehrung geringvirulenter KSPV in Zellkultur fest (Korn und Liebke, 1967; Aynaud, 1969; Aynaud *et al.*, 1972). In einem Infektionsversuch, der Zelllinien unterschiedlicher Abstammung und Passagenzahl vom Schwein und anderen Säugern umfasste, erreichte hingegen ein durch Zellkulturadaptation gewonnenes Impfvirus in den meisten Fällen eine höhere Infektionsrate als der hochvirulente Stamm *Ames* (Pirtle und Kniazeff, 1968). Offenbar war die Viruspopulation des attenuierten Stammes besser an

die Infektion unterschiedlicher Wirtszellen *in vitro* angepasst. Auch das Gesamtspektrum infizierbarer heterologer Zelllinien war beim Vaccinestamm größer. Hingegen replizierten hochvirulente KSPV deutlich besser in Alveolarmakrophagenkulturen als über Zellkulturpassagen attenuierte Stämme (Nakamura *et al.*, 1983). Die Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Vermehrung in Makrophagen und der Virulenz war zuvor bereits für andere Virusarten unter Beweis gestellt worden (Mogensen, 1979). Die Vermehrung eines infektiösen Klonen des Vakzinestammes CS in Makrophagenkulturen war gegenüber der von Klonen des hochvirulenten Stammes *Brescia* bzw. mehrerer aus CS und *Brescia* konfigurierter Chimären ebenfalls deutlich herabgesetzt (Risatti *et al.*, 2005a).

Eine hinsichtlich der Virulenz häufig untersuchte physikalische Eigenschaft ist die Widerstandsfähigkeit der Infektiosität bei Erhitzung. Hochvirulente, nur über wenige Zellkulturpassagen geführte KSPV erwiesen sich als resistenter gegenüber der Erhitzung auf 56°C bzw. 60°C als durch Dauerpassagierung unter unterschiedlichen Bedingungen modifizierte schwach- oder avirulente Viren (Kubin, 1967; Aynaud *et al.*, 1972).

Die Erfassung und Auswertung von Einschnitt-Vermehrungskurven und der Vergleich der zellgebundenen und zellfreien Virustiter stellt ein weiteres Kriterium der *in vitro*-Charakterisierung von KSPV dar (Mengeling und Drake, 1969; Danner und Bachmann, 1970; Laude, 1977; Mittelholzer *et al.*, 2000). Bei der Erfassung der Wachstumskinetik des hochvirulenten Stammes *Ames* wurde eine schnelle und effektive Freisetzung von reifem Virus aus der Zelle und dementsprechend ein höherer Virustiter im Kulturmedium als in den Zellen beobachtet (Mengeling und Drake, 1969). Dieses Verhältnis blieb auch bei Adaptation des Virus an PK-15-Zellen (27 Passagen) erhalten. Außerdem zeigte das adaptierte Virus eine kürzere Latenzperiode und höhere maximale Titer als der aus einem infizierten Schwein isolierte Originalstamm. Andere Autoren stellten bei der Untersuchung der Vermehrung des KSPV-Stammes *München-1* in PK-15-Zellen hingegen einen wesentlich geringeren Titeranstieg und Maximaltiter im zellfreien Kompartiment verglichen mit dem Virusgehalt in den Zellen fest (Danner und Bachmann, 1970). Ähnliche Verhältnisse wurden auch von anderen Autoren ermittelt, u.a. mit dem hochvirulenten Stamm *Alfort* (Aynaud, 1968; Laude, 1977).

Mittelholzer *et al.* (2000) untersuchten mehrere KSPV unterschiedlicher Virulenz im selben Versuchsansatz. Einige der moderat- und avirulenten Stämme wurden dabei durch Insertion fremder Gene ins Virusgenom oder Austausch von Genomregionen generiert oder aus permanent infizierten Zelllinien gewonnen. Die Autoren registrierten flachere Wachstumskurven und geringere Maximaltiter bei den hochvirulenten Stämmen, insgesamt

jedoch eine nur geringe Variabilität der Produktion von zellassoziertem Virus, was auf die Existenz eines zellulären Faktors, der die Akkumulation von Viruspartikeln limitiert, zurückgeführt wurde. Beim Vergleich der mittleren Titer in den Zellen und im Überstand stellte sich heraus, dass die Sekretion von Virionen in den Überstand mit größerer Effizienz bei den Viren hoher Virulenz als bei denen der niedrigeren Virulenzklassen erfolgte. Die Berechnung eines Index aus den Titern in den beiden Kompartimenten erlaubte somit die Unterscheidung zwischen hoch- und weniger virulenten KSPV. Allerdings wichen die absoluten Titer in den beiden durchgeführten Telexperimenten nicht unwesentlich voneinander ab, weswegen auf die Notwendigkeit der Mitführung eines Referenzvirus zur Vergleichbarkeit hingewiesen wurde. Gleichzeitig erfolgte die Erfassung der Menge neusynthetisierter Plusstrang-RNA im Zeitverlauf. Obgleich die dabei für die einzelnen untersuchten Viren erhobenen Werte sich zum Teil erheblich unterschieden, konnte kein Bezug zur Virulenz des jeweiligen Virus gefunden werden.

Ein weiterer möglicher Zusammenhang könnte zwischen der Ausbildung eines zytopathogenen Effekts (CPE) und der Virulenz bestehen. Eine nach wiederholter Zellkulturpassage mit CPE replizierende Variante des *Alfort 187*-Klons, *vA187-1*, unterschied sich in ihren pathogenen Eigenschaften jedoch nicht vom Ursprungsvirus (Mittelholzer *et al.*, 2000). Im Gegensatz zum verwandten BVDV, wo es mit der letalen *Mucosal Disease* ein spezielles Krankheitsbild gibt, das durch cp Viren hervorgerufen wird, ist ein solches für KSPV nicht bekannt. Entsprechend wurden bislang nur sehr wenige cp KSPV aus dem Feld isoliert (Meyers und Thiel, 1995; Kosmidou *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 2001). Andere entstanden spontan in permanent infizierten Zellkulturen oder nach serieller Passagierung in Zellen (Gillespie *et al.*, 1960; van Bekkum und Barteling, 1970; Meyers und Thiel, 1995; Mittelholzer *et al.*, 1997). Defekte interferierende (DI) Partikel stellen das cp Agens dar (Meyers und Thiel, 1995; Kosmidou *et al.*, 1995; Mittelholzer *et al.*, 1997; Kosmidou *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 2001). Dem Genom der DI-Partikel fehlen die Gene für sämtliche Strukturproteine und N<sup>pro</sup> sowie ein Teil des NS2-3-Gens. Sie sind zur Replikation auf das Vorhandensein von ncp Helferviren mit vollständigem Genom angewiesen. In mit cp KSPV infizierten Zellen ist der Gehalt an dem Nichtstrukturprotein NS3 deutlich erhöht, gleichzeitig der des, hauptsächlich von den Helferviren kodierten, NS2-3 herabgesetzt (Meyers und Thiel, 1995; Mittelholzer *et al.*, 1997). Bei BVDV wird NS3 ausschließlich von cp Viren generiert und gilt als Zytopathogenitätsmarker. Im Gegensatz dazu produzieren auch ncp KSPV beide Proteine (Lindenbach und Rice, 2001), vermutlich ist jedoch eine bestimmte Konzentration von NS3 zur Ausprägung eines CPE erforderlich (Meyers und Thiel, 1995). Wahrscheinlich

wird durch NS2-3 bzw. NS2 die Akkumulation neusynthetisierter Virus-RNA in der Zelle reguliert und so die Inangangsetzung einer Apoptosereaktion verhindert (Zhang *et al.*, 1996; Moser *et al.*, 1999; Vassilev und Donis, 2000). In den von Mittelholzer *et al.* (2000) durchgeführten Western Blot-Untersuchungen zur Kinetik der NS3-Synthese waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Viren ablesbar. Beziehungen zwischen NS3-Konzentration bzw. Zytopathogenität und Virulenz scheinen demzufolge nicht zu bestehen. Da ausschließlich ncp Pestiviren zur persistierenden Infektion eines Wirtes in der Lage sind (Tautz *et al.*, 1996; Moser *et al.*, 1999), stellt eine zum CPE führende (erhöhte) Expression von NS3 vermutlich eher einen Selektionsnachteil dar.

Der durch cp Pestiviren ausgelöste CPE kommt durch Apoptose der infizierten Zellen zustande (Zhang *et al.*, 1996; Aoki *et al.*, 2001). Diese ist ebenfalls induzierbar durch Inaktivierung der RNase-Aktivität des viralen Glykoproteins E<sup>rns</sup> (Hulst *et al.*, 1998). Ein durch Mutagenese hergestelltes, RNase-negatives Virus zeigte dabei die gleichen Wachstumseigenschaften in Zellkultur wie der dazugehörige Wildtyp, ein Klon des Vakzinestammes C. Die Infektion von Schweinen mit RNase-negativen Mutanten der hochvirulenten Stämme *Alfort/Tübingen* und *Eystrup* führte jedoch nicht zu klinischen Erscheinungen und nicht zur Depletion von B-Zellen als charakteristischem Ereignis der KSPV-Infektion (Meyers *et al.*, 1999). Ein Teil der Mutanten war vollständig apathogen, während andere eine milde Erkrankungsform mit plötzlicher Genesung hervorriefen. In ihren Wachstumseigenschaften *in vitro* stimmten alle Mutanten mit den Wildtypviren überein. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch Mutation der gleichen E<sup>rns</sup>-Domäne bei BVDV erzielt (Meyer *et al.*, 2002). Die klinische Erholung trat dabei um den 10. *d p.i.* ein, also zu einem Zeitpunkt, an dem normalerweise mit dem Einsetzen einer adaptiven Immunantwort zu rechnen ist. Dies ließe darauf schließen, dass die Funktion von E<sup>rns</sup> in der Verzögerung einer solchen Immunantwort begründet liegt. In Folgeexperimenten mit weiteren RNase-negativen KSPV stellte sich heraus, dass die fehlende B-Zell-Reduktion keine generelle Eigenschaft solcher Mutanten darstellt (von Freyburg *et al.*, 2004). Die Infektion führte bei den verwendeten Schweinen wie die Infektion mit Wildtypvirus zunächst zu einer generellen Leukopenie, bei der neben den B-Zellen auch T-Zellen, Monozyten und Makrophagen betroffen waren. Im weiteren Verlauf kehrten die Leukozytenwerte bei den mit den Mutanten infizierten Tieren jedoch wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück. Bemerkenswert ist, dass die Viruslast im Blut bei der Infektion mit Wildtypvirus wesentlich höher war als bei Infektion mit den RNase-negativen Mutanten. Die Reduktion der Viruslast stellt ein weiteres

Attenuierungsmerkmal solcher KSPV-Mutanten dar. Die Aktivität der RNase ist somit ein für Virulenz und Viruspersistenz wichtiger Faktor (Hulst *et al.*, 1998).

E<sup>ms</sup> erwies sich außerdem als zytotoxisch für Lymphozyten verschiedener Spezies, wie bereits in Kapitel 2.3.2. angeführt (Bruschke *et al.*, 1997). Diese Wirkung blieb auf Lymphozyten beschränkt, Epithelzellen wurden nicht geschädigt. Vermutlich spielt das Protein bei der durch KSPV-Infektionen ausgelösten Immunsuppression eine Rolle.

Mehrere Aminosäureaustausche in den Glykoproteinen E<sup>ms</sup> und E2 führten zu einer Reduktion der Virulenz eines Klons des hochvirulenten Stammes *Brescia* (van Gennip *et al.*, 2004). Eine hohe Affinität von E<sup>ms</sup> zu Heparansulfat bedingte dabei eine geringere Ausbreitung des Virus und offenbar gemeinsam mit der durch die Mutationen veränderten Oberflächenstruktur von E2 eine weniger effiziente Infektion spezifischer Targetzellen *in vivo*. Chimären aus *Brescia* und dem Vakzinestamm *CS*, bei denen (u.a.) das Glykoprotein E2 von *CS* stammte, stellten sich im Schwein als attenuiert heraus (Risatti *et al.*, 2005a). Ihre Wachstumseigenschaften in primären Makrophagenzellkulturen entsprachen denen des *Brescia*-Originalstammes. Chimären, die sämtliche Strukturproteine von *Brescia* vor dem genetischen Hintergrund von *CS* enthielten, zeigten ebenfalls einen attenuierten Phänotyp. Zusätzliche Mutationen außerhalb der Strukturproteinregion schienen also ebenfalls Bedeutung für die Avirulenz von *CS* zu besitzen. Gleichwohl war das Glykoprotein E2 von *CS* alleinig ausreichend für die Attenuierung von *Brescia in vivo*, was für eine signifikante Rolle des Proteins in der Virulenzausprägung von KSP-Viren spricht. In welchen spezifischen Mechanismen der funktionelle Unterschied zwischen den E2-Proteinen von *Brescia* und *CS* begründet liegt, konnte im Rahmen von Sequenzanalysen nicht geklärt werden. Bei Sequenzvergleichen der E2-Region von KSPV, die in den Jahren 2001 bis 2003 auf Kuba isoliert wurden mit solchen aus den 1990er Jahren wurde deutlich, dass eine signifikante Fraktion der festgestellten Mutationen Aminosäureaustausche nach sich zogen. Gleichzeitig ließ sich eine Abschwächung der klinischen Symptomatik bei einem Großteil der infizierten Tiere beobachten (de Arce *et al.*, 2005).

Mittelholzer *et al.* (2000) erhoben in ihren Untersuchungen ebenfalls Daten zur Expressionskinetik von E2, die jedoch für die dort getesteten Virusstämme keine mit der Virulenz in Zusammenhang stehenden Unterschiede zeigten.

Ein drittes Strukturprotein, das Glykoprotein E1 ist offenbar ebenfalls von Bedeutung für die Virulenz: Eine *Brescia*-Mutante, die eine Insertion am Carboxylterminus von E1 trug, war im Schwein gegenüber dem Wildstamm deutlich attenuiert (Risatti *et al.*, 2005b). Auch hier

konnte ein Unterschied zwischen den Wachstumseigenschaften der Mutante und des Wildtypvirus *in vitro* nicht verzeichnet werden.

Einfluss auf die Ausprägung der Virulenz von KSPV nimmt außerdem ein weiteres Nichtstrukturprotein, die N-terminale Autoprotease N<sup>pro</sup>. Sie spaltet sich zu Beginn der Prozessierung vom viralen Polyprotein ab. Ihr Austausch im Virusgenom von *Alfort 187* gegen das murine Ubiquitin-Gen hatte auf die Vermehrung des Virus in Zellkultur keinen Einfluss (Tratschin *et al.*, 1998). Gelegentlich kam es zur Ausbildung eines CPE, wobei subgenomische RNA gleichen Typs wie bei anderen cp KSPV isoliert werden konnte. Ubiquitin-kodierende Sequenzen spielen auch als Insertionen in einigen cp BVDV-Stämmen eine Rolle. Dort liefern sie das Prozessierungssignal für eine zelluläre Ubiquitin-Hydrolase, die die Generierung des NS3-Proteins als Markerprotein der Zytopathogenität katalysiert (Meyers und Thiel, 1996).

N<sup>pro</sup>-Deletionsmutanten der moderat- bzw. hochvirulenten Stämme *Alfort 187* und *Eystrup* erwiesen sich im Tierexperiment als vollständig attenuiert (Mayer *et al.*, 2004). In beiden Fällen trat eine starke Ak-Antwort auf. Nach Austausch des N<sup>pro</sup>-Gens von *Eystrup* gegen das des Vakzinestammes *Riems* war das resultierende Virus nach wie vor hochvirulent. Die Virulenz von KSPV ist mit der Präsenz von N<sup>pro</sup> verknüpft, das Protein ist jedoch nicht verantwortlich für deren Variabilität.

Die Fähigkeit von KSPV zur Interferenz mit der zellulären Immunabwehr steht ebenfalls mit der Präsenz des N<sup>pro</sup>-Gens in Zusammenhang (Ruggli *et al.*, 2003). So verfügten mit Wildtypvirus infizierte SK-6-Zellen über eine 100-fach erhöhte Resistenz gegen einen Apoptosereiz, die nach Infektion mit einer N<sup>pro</sup>-Deletionsmutante nicht vorhanden war. Dieselbe Mutante induzierte in Makrophagen die Synthese von Typ I-Interferon, welche bei Infektion mit Wildtyp-KSPV gehemmt wurde. Ein ähnlicher Effekt konnte bei der Infektion von Gefäßendothelzellen mit *Alfort 187* beobachtet werden. Es kam zu einem Anstieg der Transkriptionslevel proinflammatorischer Zytokine sowie von Faktoren, die an einer Erhöhung der Zellpermeabilität beteiligt sind (Bensaude *et al.*, 2004). Gleichzeitig waren die Zellen nicht in der Lage, Interferon I zu produzieren und zeigten keine Reaktion auf einen Apoptosereiz. Interferone gelten als wichtige Regulatoren der virusinduzierten Apoptose (Tanaka *et al.*, 1998). Die KSPV-Infektion kann somit in den Zellen persistieren, während Entzündungen und Permeabilitätsstörungen maßgeblich an Hämorrhagien und Koagulopathien, wie sie im Rahmen der akuten KSP beobachtet werden, beteiligt sind.

Die interferierende Wirkung von KSPV gegenüber Faktoren des unspezifischen zellulären Immunsystems erwies sich schon vor längerer Zeit an Hand der Tatsache, dass eine KSPV-

Infektion die Vermehrungsrate von *Newcastle Disease-Virus* in der Zellkultur erhöht (Kumagai *et al.*, 1958). Es wurde bereits damals vermutet, dass dieser Effekt durch Suppression der Interferonproduktion in den infizierten Zellen zustande kommt (Toba und Matumoto, 1969). Die supprimierende Wirkung ist jedoch unabhängig von Herkunft und Virulenz des jeweiligen KSPV, der Grad der Hemmung unterscheidet sich nicht signifikant zwischen mit virulenten KSPV und mit Vakzinestämmen infizierten Zellen (Ruggli *et al.*, 2003).

In vielfältiger Weise wurden auch antigene Eigenschaften und Genomsequenzen im Hinblick auf Merkmalsunterschiede mit Bezug zum Virulenzgrad analysiert. Stämme, die eher chronische oder inapparente Infektionen im Feld auslösten, wurden in verschiedenen Untersuchungen als serologisch näher verwandt zu BVDV charakterisiert (Corthier *et al.*, 1974; Kamijyo *et al.*, 1977). An anderer Stelle konnte hingegen bei der phäno- und genotypischen Analyse von 66 Pestiviren kein Zusammenhang zwischen der Einordnung der KSPV in eine bestimmte Gruppe und der Virulenz *in vivo* festgestellt werden (Paton *et al.*, 1995). Alle getesteten hochvirulenten Stämme (z.B. *Alfort 187* und *Brescia*) gehörten zwar derselben phylogenetischen Gruppe an, in dieser befanden sich jedoch auch Isolate geringerer Virulenz (z.B. *Bergen*).

Eine molekulare Determinante der Virulenz konnte ebenfalls bislang nicht benannt werden (Moennig, 2000; Mittelholzer *et al.*, 2000). Die 3'UTR mehrerer lapinisierten Vakzinestämme enthielt zwar eine nahezu identische Insertion, die keiner der gleichfalls untersuchten virulenten KSPV aufwies (Bjorklund *et al.*, 1998). Diese kommt gleichwohl nicht als Attenuierungs- bzw. Differenzierungsmarker in Frage, da sie in anderen Impfstämmen nicht auftrat. Ebenso erbrachte die Analyse der Sekundärstruktur der 3'UTR keine Unterschiede zwischen virulenten Isolaten und Impfstämmen. Viren, die über einen Zeitraum von 4 Jahren aus einer bestimmten Region isoliert wurden, erwiesen sich in einer Sequenzanalyse von NS5B- und E2-Region als nicht unterscheidbar, obgleich sie aus Ausbrüchen unterschiedlicher Schwere stammten (Vilcek und Paton, 1998). Offenbar ist das Genom des KSPV relativ stabil, während die Virulenz einer „großen passiven Variabilität“ (Korn, 1965) unterliegt.

### 2.5. *Die Klassische Schweinepest beim Schwarzwild*

#### 2.5.1. Vorkommen

Die ersten Erwähnungen der KSP beim Hausschwein stammen aus den Jahren 1810 - Tennessee, USA - bzw. 1833 - Ohio, USA (Hanson, 1957). Als erstes europäisches Land war Großbritannien im Jahr 1879 von einer größeren Anzahl von Ausbrüchen betroffen (Beynon, 1962). In Deutschland tauchte die Krankheit in den 90er Jahren des 19. Jahrhunderts beim Hausschwein auf und wurde im Jahre 1896 schließlich erstmals bei Wildschweinen in einem Wildgatter diagnostiziert (Bley, 1925). Seitdem konnte sie in Deutschland, wie auch in anderen europäischen Staaten nie wieder ganz getilgt werden (Dahle und Liess, 1992). Bis in die 1950er Jahre hinein wurde dem Auftreten der KSP beim Schwarzwild jedoch keine besondere Bedeutung beigemessen (Hutter, 1953). Die Tilgung gelang vermutlich auf Grund der geringeren Schwarzwilddichte meist innerhalb relativ kurzer Zeiträume, und wirtschaftliche Verluste fielen in den weniger konzentrierten Schweinehaltungen vergangener Tage nicht wie im heutigen Maße ins Gewicht (Kaden, 1998). Nachdem die Anzahl der Wildschweine in den europäischen Staaten in den vergangenen Jahrzehnten jedoch sprunghaft angestiegen ist, treten neben den früher bekannten meist kurzzeitigen Ausbrüchen auch Seuchenzüge auf, die sich über einen Zeitraum von mehreren Jahren erstrecken. In der letzten Dekade des 20. Jahrhunderts kam die KSP in Westeuropa außerhalb Deutschlands in den Schwarzwildpopulationen Frankreichs, Italiens, Österreichs und der Schweiz vor (Krassnig und Schuller, 1993; Laddomada *et al.*, 1994; De Mia und Sacchi, 1998; Krassnig, 1998; Cruciere *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 1998; Patta *et al.*, 1998; Hofmann *et al.*, 1999). In einigen Staaten Osteuropas spielt die KSP beim Schwarzwild ebenfalls seit mehreren Jahrzehnten eine nicht zu unterschätzende Rolle (Kaden, 1999).

In Deutschland gab es nach einigen Jahren der Seuchenfreiheit ab 1989 (Bundesland Hessen) wieder mehrere KSP-Ausbrüche beim Schwarzwild. Betroffen waren im folgenden Jahrzehnt Gebiete in den Bundesländern Hessen, Rheinland-Pfalz, Niedersachsen, Brandenburg, Baden-Württemberg, Sachsen-Anhalt und Mecklenburg-Vorpommern (Kaden, 1998; Kaden, 1999; Kaden *et al.*, 2002). Auf die Situation in den Ländern Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg, aus denen die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Virusisolate stammen, soll im Folgenden kurz eingegangen werden: Insbesondere der Seuchenverlauf in Mecklenburg-Vorpommern zeichnete sich durch einen langzeitigen Verlauf mit kurzen Unterbrechungen und durch Krankheitsbilder unterschiedlicher Schwere aus (Steyer, 2000). Die Krankheit wurde nach 10-jähriger Seuchenfreiheit im Jahre 1993 im Kreis

Nordvorpommern erstmals wieder festgestellt. Von hier aus breitete sie sich in südwestliche und östliche Richtung aus und hatte nach 2 Jahren in ihrer Gesamtausdehnung ca. 2 Drittel der Fläche des Bundeslandes erfasst, dass mit seinem Wechsel von ausgedehnten Kultur- und Waldflächen dem Schwarzwild ein ideales Habitat bietet (Laddomada, 2000). Seit dem Ende des Jahres 1995 war eine Verminderung der Virusinzidenz zu verzeichnen. Letzte Virusnachweise stammen aus dem Jahr 2000. Im Bundesland Brandenburg war die Wildschweinepest ab März 1995 präsent. Sie griff vom Ort der ursprünglichen Virusisolierung auf weitere Kreise über. Ab 1997 kam es auch hier zu einem Rückgang der Virusinzidenz, und im Jahr 2000 wurde bisher letztmalig Virus aus der Schwarzwildpopulation isoliert. Im Gegensatz zum Seuchenverlauf in Mecklenburg-Vorpommern, wo neben klassischen auch protrahierte und subklinische Verläufe auftraten (Heyne und Kiupel, 1997; Kaden, 1998), wurde in Brandenburg eher ein akutes Krankheitsgeschehen beobachtet (Letz, 1997). Der Phänotyp der beim Schwarzwild isolierten Viren stimmte jeweils mit dem von Hausschweinen im Gebiet stammender Isolate überein, was auf einen engen Zusammenhang der Ausbrüche bei beiden Tierarten hinweist (Kaden, 1998; Fritzeimer *et al.*, 2000). In beiden Bundesländern trat in der Hauptsache der Phänotyp Flandern '90 auf. Die Charakterisierung auf Sequenzebene führte zur Unterscheidung von 2 Genotypen, 2.3 Rostock und 2.3 Güstrow (Strebelow und Kaden, 1998; Fritzeimer *et al.*, 1998; Wonnemann *et al.*, 2001). Außerdem konnte im Gebiet des Forstamtes Spantekow im Kreis Ostvorpommern im Jahre 1998 von einem kranken Überläufer ein KSPV isoliert werden, das zwar ebenfalls dem Subtyp 2.3 angehörte, jedoch größere Unterschiede zu den Nukleotidsequenzen der Typen 2.3 Rostock und 2.3 Güstrow aufwies (Strebelow, unveröffentlicht). Es wurde in der Folgezeit von 3 weiteren in der Umgebung des ursprünglichen Fundortes erlegten, augenscheinlich gesunden Wildschweinen isoliert und unter der Bezeichnung *Spante* in die aktuellen genetischen Stammbäume aufgenommen (Wonnemann *et al.*, 2001). Danach traten in diesem Gebiet jedoch keine weiteren Fälle von KSP bei Wildschweinen mehr auf (Kaden *et al.*, 2000c).

### **2.5.2. Epidemiologische Rolle des Schwarzwildes im Seuchengeschehen**

Man geht heute davon aus, dass das Schwarzwild bei der Verbreitung der KSP eine wichtige Rolle spielt (Kaden, 1998; Laddomada, 2000; Moennig, 2000; Fritzeimer *et al.*, 2000; Artois *et al.*, 2002). Wild- und Hausschweine sind für das Virus gleichermaßen empfänglich (Brugh *et al.*, 1964; Depner *et al.*, 1995). Zwar scheint die Schwarzwildpopulation kein natürliches Erregerreservoir darzustellen, jedoch können Infektionsherde mitunter über lange Zeit

erhalten bleiben (Dahle *et al.*, 1993; Kaden, 1999; Artois *et al.*, 2002). Wiederholt sind epidemiologische Zusammenhänge zwischen Infektionen bei Wild- und Hausschweinen aufgedeckt worden (Wachendörfer *et al.*, 1978; Krassnig und Schuller, 1993; Laddomada *et al.*, 1994; Teuffert *et al.*, 1997). Der Eintrag von Virus in eine Schwarzwildpopulation erfolgt in der überwiegenden Anzahl der Fälle durch die Verfütterung infizierter Speise- und Schlachtabfälle (Hofmann *et al.*, 1999; Kaden, 1999; Moennig, 2000). Die Stärke der Verbreitung innerhalb der Population ist von der Virulenz des eingeschleppten Erregers, dem geografischen Profil des betroffenen Gebietes, insbesondere aber von der Größe und Dichte der Population abhängig (Kaden, 1998; Kaden, 1999; Laddomada, 2000; Moennig, 2000; Kaden und Müller, 2001). Letztere bestimmen die Anzahl empfänglicher Tiere und beeinflussen die Frequenz von Sozialkontakten insbesondere zwischen Tieren verschiedener Rotten. Die Virulenz hat Einfluss auf die Letalitätsrate sowie die Zeitdauer, während der das einzelne Tier Virus ausscheidet. Vor allem auf Grund der hohen Wildschweinedichte in manchen Gebieten sind größere Epidemien nicht immer selbst limitierend. Das Virus wird zwischen den Wildschweinen durch direkte und indirekte Kontakte (unbelebte Vektoren, wie z.B. Äsungsflächen, Suhlen oder Futterstellen und belebte Vektoren, wie z.B. Raubwild, Vögel, Hunde oder der Mensch) übertragen (Kaden, 1998; Kaden, 1999; Kaden *et al.*, 2000a; Kaden und Müller, 2001). Dies geschieht zum einen durch Wildschweine, die klinisch krank sind bzw. sich in der Inkubationszeit befinden, zum anderen durch solche, die chronisch oder persistent infiziert sind und das Virus somit über einen längeren Zeitraum unerkannt in sich tragen und ausscheiden (Kaden, 1999). Eine besondere Rolle im KSP-Geschehen können tragende Bachen spielen, die mit Viren schwacher Virulenz infiziert werden (Kaden, 2000). Ähnlich wie beim Hausschwein (vgl. 2.2.2. ) besteht die Möglichkeit der diaplazentaren Übertragung des Virus und der Geburt persistent infizierter Frischlinge, die stetig Virus ausscheiden und zwar lebensschwach, im Feld jedoch vermutlich nicht in jedem Falle als kranke Tiere zu erkennen sind. Im Rahmen einer experimentellen Infektion überlebte ein solcher Frischling für die Dauer von 39 Tagen (Depner *et al.*, 1995). Unter Praxisbedingungen muss möglicherweise von einer noch wesentlich längeren Lebensdauer ausgegangen werden (Kaden, 1999). Allerdings scheinen diaplazentare Infektionen im Feld im Hinblick auf die Viruspersistenz von untergeordneter Bedeutung zu sein, wie neuere Untersuchungen in einem endemisch verseuchten Gebiet gezeigt haben (Kaden *et al.*, 2005). Auch gegenüber einer postnatalen Infektion sind Tiere der Jugendklasse am anfälligsten, erkranken in der Regel schwerer und kommen somit in erster Linie als Virusüberträger in Betracht (Heyne und Kiupel, 1997; Treu und Nieders, 1997; Depner *et al.*, 1998; Kern, 1998;

Kaden *et al.*, 2004). In einer Studie über die Virusinzidenz während der Epidemie in Brandenburg von 1995 bis 1997 lag der höchste Anteil infizierter Tiere in der Gruppe der Frischlinge unter 10 kg Körpergewicht, während bei Alttieren mit einem Körpergewicht von mehr als 75 kg in keinem Falle Virus nachgewiesen wurde (Kern *et al.*, 1999). Die experimentelle Infektion von Frischlingen, welche noch teilweise durch maternale Ak geschützt sind, resultiert in einem eher transienten Krankheitsverlauf (Depner *et al.*, 2000). Solche Tiere können in nicht unbedeutender Weise zur Virusverbreitung beitragen. Schließlich spielen auch Bejagungsfehler, wie das Strecken von Führungsbächen oder Treibjagden mit Hunden durch die Versprengung von Rotten bei der Seuchenverbreitung eine Rolle (Kaden, 1998; Laddomada, 2000).

Für die Übertragung von Virus vom Wildschwein auf Hausschweinebestände kommen ähnliche Mechanismen in Frage wie bei der Übertragung innerhalb der Schwarzwildpopulation. Eine Studie ergab, dass 52% aller KSP-Ausbrüche bei Hausschweinen in Deutschland zwischen 1993 und 1995 auf direkte oder indirekte Kontakte mit infizierten Wildschweinen zurückzuführen waren (Fritzemeier *et al.*, 1998). Der direkte Kontakt spielt dabei vermutlich nur in Einzelfällen eine Rolle (Beindorf *et al.*, 1997; Kaden und Müller, 2001), z.B. im Seuchengeschehen auf Sardinien, wo das KSPV durch stetige Kontakte zwischen im Freien gehaltenen Hausschweinen und Schwarzwild seit Jahren persistiert (Laddomada *et al.*, 1994; Patta *et al.*, 1998). Jäger, deren Hunde, Vögel oder Insekten kommen bei der indirekten Übertragung als lebende Vektoren in Betracht (Kaden, 1998; Kaden, 1999). Besondere Bedeutung hat die Verfütterung von Wildbret. Auch der jüngste Ausbruch der KSP bei Hausschweinen in Deutschland (Nordrhein-Westfalen, März bis Mai 2006) wurde höchstwahrscheinlich durch die Verfütterung von Wildschweinefleisch verursacht (Heilemann, persönliche Mitteilung). Außerdem trägt der Kontakt mit kontaminierten Arbeitsgegenständen, Futtermitteln, Einstreu oder Exkrementen von Wildschweinen zur Virusübertragung bei (Kaden *et al.*, 1992; Depner *et al.*, 1997b; Kaden, 1998; Kaden, 1999; Moennig, 2000). Über den Import von Wildbret kann das KSPV in bisher virusfreie Staaten eingeschleppt werden (Krassnig *et al.*, 1995; Hofmann und Bossy, 1998). Die Notwendigkeit einer ausreichend gründlichen Kontrolle von Wildfleisch ist in diesem Zusammenhang besonders zu unterstreichen (Laddomada, 2000).

### **2.5.3. Bekämpfung der KSP beim Schwarzwild**

Die Seuchenbekämpfung in Wildschweinebeständen setzte sich früher vor allem aus jagdlichen und veterinärhygienischen Maßnahmen sowie einer gründlichen Diagnostik

zusammen. Seit einigen Jahren trägt die orale Immunisierung (o.I.) zur Komplettierung der Maßnahmen bei (Kaden *et al.*, 2000b; Kaden *et al.*, 2002; Kaden und Lange, 2004).

Für das Epidemiegebiet selbst wird von einigen Autoren zunächst eine mehrmonatige Jagdruhe empfohlen, um darin befindliches Schwarzwild nicht zu beunruhigen und so die Verschleppung des Virus in angrenzende Gebiete zu verhindern (Hofmann *et al.*, 1999; Laddomada, 2000; Schnyder *et al.*, 2002). In der Umgebung der Infektionszone und nach Erreichen eines gewissen Durchseuchungsgrades auch in der Zone selbst ist eine verstärkte Bejagung jedoch notwendig und sinnvoll zur Populationsreduktion (Kaden, 1999; Laddomada, 2000; Kaden *et al.*, 2000b). Das Jagdregime muss sich dabei im besonderen Maße auf Jungtiere konzentrieren, die die für das Virus empfänglichste Gruppe darstellen (Kaden, 1999; Laddomada, 2000; Kaden *et al.*, 2000a; Kaden *et al.*, 2000b; Kaden *et al.*, 2001; Kaden *et al.*, 2002; Schnyder *et al.*, 2002; Zanardi *et al.*, 2003). Ziel ist die Unterbrechung der Infektionskette zwischen infizierten Virusausscheidern und empfänglichen Tieren.

Ein umfassendes virologisches und serologisches Monitoring an gestreckten Stücken sowie Fallwild im Seuchengebiet selbst und in den angrenzenden Überwachungszonen dient der Ermittlung des aktuellen Verseuchungsgrades sowie der frühzeitigen Erkennung von Tendenzen im Seuchengeschehen (Kaden, 1999; Kaden *et al.*, 2000a).

Die spezielle Seuchenhygiene umfasst sowohl die unschädliche Beseitigung infizierter Kadaver oder von Wildbret als auch alle Maßnahmen, die das Verschleppen von Virus bei der Jagd, dem Transport des Tierkörpers, dessen Aufbewahrung usw. verhindern (Kaden, 1999; Laddomada, 2000; Kaden *et al.*, 2000a).

In vielen Regionen erweist sich insbesondere auf Grund der hohen Schwarzwilddichte die Kontrolle der Infektion durch die herkömmlichen Maßnahmen von Jagd, Veterinärhygiene und Diagnostik als schwierig bzw. nicht ausreichend (Kaden *et al.*, 2000b). Die o.I. kommt in solchen Fällen als zusätzliche Bekämpfungsstrategie in Frage. Ihr Ziel ist die Erhöhung des Anteils an Tieren im Bestand, die gegen das KSPV immun sind und somit letztendlich die Unterbrechung der Infektionskette (Kaden, 1999; Kaden *et al.*, 2000b; Kaden *et al.*, 2002). In Deutschland wurden in den vergangenen Jahren dazu mehrere Feldversuche in verschiedenen Bundesländern, u.a. auch in Mecklenburg-Vorpommern und in Brandenburg durchgeführt (Kaden *et al.*, 2002). Insgesamt kam es zu einem signifikanten Rückgang der Virusinzidenzen bereits kurz nach Beginn der Immunisierungsmaßnahmen. Auf Grund des hohen Infektionsdruckes, und der hohen Populationsdichte mit einem großen Anteil junger Tiere vergingen dennoch in beiden Ländern mehrere Jahre bis zur Tilgung der Seuche. Eine

besondere Rolle spielt daher bei der Durchführung der o.I. die Frischlingspopulation. Die relativ großen Impfstoffköder werden von Jungtieren, die zudem in der Rangordnung der Rotte weit unten stehen, oft nicht in ausreichendem Maße aufgenommen. Zusätzlich wird der Zustand der immunologischen Reife von jungen Wildschweinen erst relativ spät erreicht (Kaden, 1999; Kaden *et al.*, 2002). Infolgedessen reichen mitunter die Zunahme der Immunitätsrate und die Senkung der Virusprävalenz in dieser Tiergruppe nicht aus. Es wird vermutet, dass es zur unerkannten Viruspersistenz in einer teilimmunisierten Population kommen kann (Laddomada, 2000). Dies ließ sich in Laborversuchen jedoch nicht bestätigen (Kaden *et al.*, 2001). Die zusätzliche intensive Bejagung insbesondere der Frischlingspopulation ist, wie oben bereits aufgeführt, deshalb für eine erfolgreiche Seuchentilgung unerlässlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die o.I. als zusätzliche effektive Maßnahme zur Kontrolle der KSP dient. Indiziert ist sie insbesondere in Gegenden mit hoher Schwarzwilddichte, wenn das infizierte Gebiet sehr weitläufig ist, ein hoher Infektionsdruck und damit eine gesteigerte Gefährdung der Virusübertragung auf Hausschweine besteht oder in Regionen mit endemischer KSP (Kaden *et al.*, 2002).