

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Tierexperimentelle Studien

Die Durchführung der Tierexperimente diente der Feststellung des Virulenzgrades der untersuchten Feldisolate sowie der Beantwortung der Frage, ob bei Haus- und Wildschwein speziesabhängig Unterschiede in der Viruswirkung zu erwarten sind.

Die Darstellung der Verläufe von Rektaltemperaturen, klinischen Indices, KSPV-Titern sowie den Titern der neutralisierenden Ak im Diagramm erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Excel als Punktediagramm mit interpolierten Linien.

#### 4.1.1. Infektion von Hausschweinen mit dem KSPV-Feldisolat 95/1279

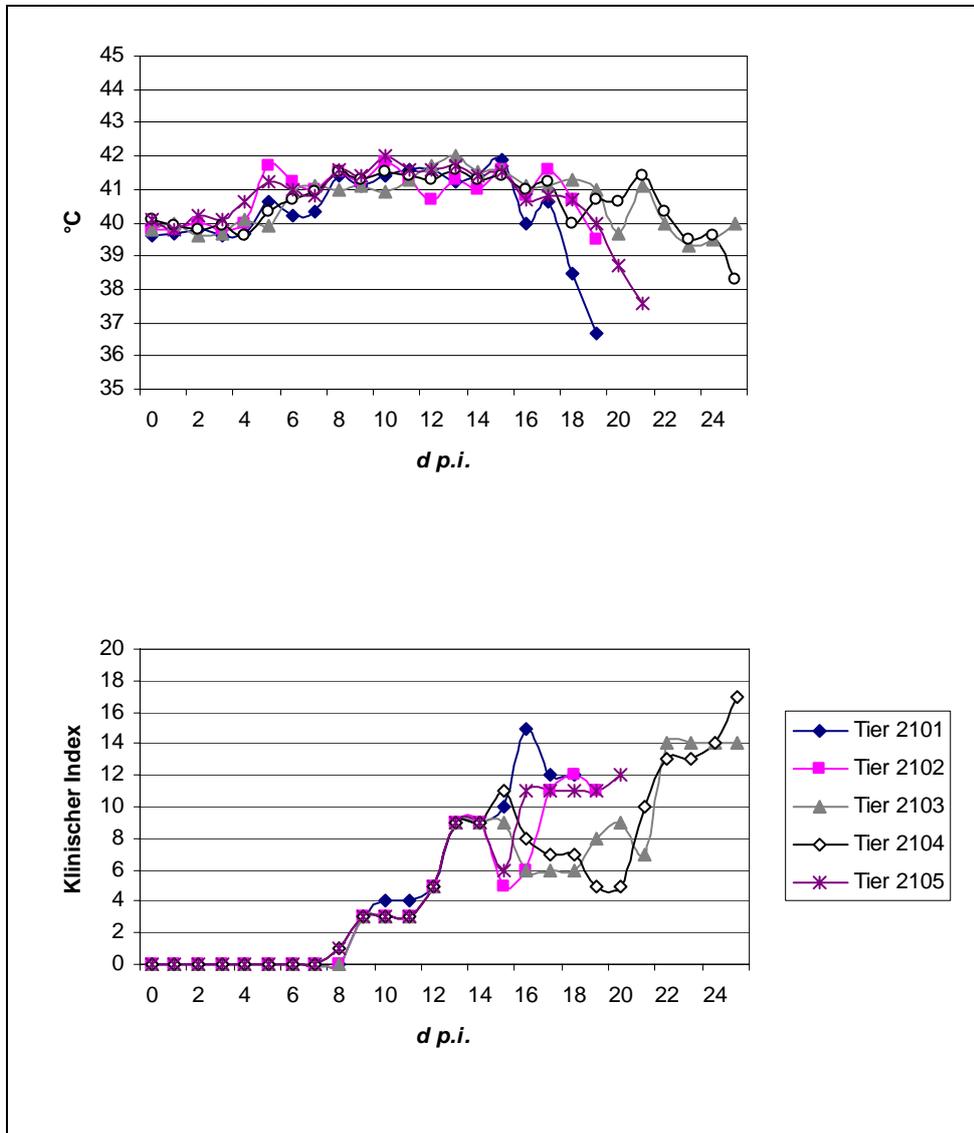
##### 4.1.1.1. Klinisches Bild

Nach der Infektion mit dem Isolat 95/1279 wurden ab 5. *d p.i.* Körpertemperaturen von mehr als 41°C gemessen, die erst 1 bis 2 Tage vor dem Tod des jeweiligen Tieres wieder abfielen (Abb. 3). Erschwertes Atmen nach Belastung (Probenahme) war ebenfalls ab 5. *d p.i.* bei mehreren Tieren zu verzeichnen. Am 10. *d p.i.* war der Allgemeinzustand aller Tiere in der Gruppe ggr. bis mittelgradig (mgr.) eingeschränkt. Die Symptomatik beinhaltete verminderte Lebhaftigkeit, eingeschränkte Futteraufnahme, Atemstörungen (Atmung „schniefend“ bis pumpend) sowie breiigen oder wässrigen Durchfall bei einem Teil der Tiere. Bis zum 18. *d p.i.* war das Krankheitsbild in voller Stärke ausgeprägt. Tier 2101 lag bereits fest und verendete am nächsten Tag, die restlichen Tiere erhoben sich nur nach Auftreiben und zeigten teilweise schwankenden Gang. Die Futteraufnahme war zu diesem Zeitpunkt hochgradig (hgr.) vermindert bis völlig eingestellt. Alle Tiere zeigten Diarrhoe von breiiger bis wässriger Konsistenz und pumpende Atmung, z.T. mit stoßweisem Husten verbunden. Die Haut aller Tiere wies zyanotisch verfärbte Bezirke v.a. im Kopfbereich (Ohren) und an den Gliedmaßen auf. Bei Tier 2102 war der gesamte Rumpfbereich von petechialen Hautblutungen bedeckt (Abb. 4). Am 20. *d p.i.* starb ein weiteres Tier (2102), und eines wurde moribund getötet (2105). Die beiden übrigen Tiere verendeten am 26. *d p.i.* ohne sich klinisch zu erholen. Hieraus ergibt sich eine durchschnittliche Überlebensrate von 23 Tagen, dies entspricht einem subakuten Erkrankungsverlauf.

#### 4. Ergebnisse

Abb. 3 gibt einen Überblick über die Höhe des aus den Einzelsymptomen berechneten klinischen Index im Versuchsverlauf. Der Index lag im Mittel ab dem 16. *d p.i.* über 10 Punkten und erreichte einen Spitzenwert von 17 Punkten bei Tier 2104 (25. *d p.i.*).

**Abb. 3:** Rektaltemperaturverlauf (oben) und klinischer Index (unten) der Absatzferkel nach Infektion mit Isolat 95/1279



**Abb. 4:** Hgr. Verminderung der Allgemeinbefindens (li.) und Hautveränderungen (petechiale Blutungen im Rumpfbereich, re.) bei den Absatzferkeln (Infektion mit Isolat 95/1279)



### 4.1.1.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Die pathomorphologischen Veränderungen bei den Hausschweinen waren vielfältig. Alle Tiere zeichneten sich durch einen kachektischen Ernährungszustand aus. Die Tonsillen waren blutig durchtränkt und wiesen zum Teil miliare Nekroseherde auf. Die Lymphknoten zeigten sich mäßig bis stark geschwollen und im Anschnitt blutig durchtränkt oder marmoriert. Der Kehledeckel wies blutige Imbibitionen (Tier 2102) bzw. Petechien auf. Letztere fanden sich außerdem auf den Nieren (besonders bei Tier 2102) und der Harnblase sowie submukös in Magen und Jejunum (Tiere 2101 und 2102). Die Lungen aller Tiere wiesen Symptome einer katarrhalischen Bronchopneumonie auf, außerdem wurden subseröse Blutungen (Tiere 2101 und 2102) und Verklebungen zwischen den Lungenlappen oder mit der Pleura costalis (Tiere 2101 und 2103) beobachtet. Bei den Tieren 2103 und 2105 hatte die Bronchopneumonie kruppösen Charakter. Die Pleura costalis war bei einem Teil der Tiere (2101, 2102, 2105) durch spritzerartige Blutungsherde gekennzeichnet. An den Herzen aller Tiere fanden sich ebenfalls mehr oder weniger ausgeprägte subseröse Blutungen, v.a. im Bereich der Herzohren. Die Milzen wiesen Schwellungen (Tiere 2101 und 2102) oder Fibrinablagerungen auf der Oberfläche (Tiere 2103 und 2104) auf. Bei Tier 2102 wurde eine diphtheroide Gastritis mit multiplen Blutungen diagnostiziert. Im Kolon waren submuköse Petechien oder größere Blutungsherde sowie zirkumskripte diphtheroide Beläge (Tiere 2101, 2103 und 2105) präsent. Eine diphtheroide Nekrotisierung der Ileozäkalklappe wurde bei allen Tieren diagnostiziert. Die Tiere 2103 und 2104 wiesen außerdem Anzeichen einer Peritonitis auf.

### 4.1.1.3. Virusnachweis

Die Tab. 2 fasst die Resultate der Virusanzucht (VA) aus BC-Zellen und Nasentupferproben und der RT-PCR bzw. n-PCR aus Vollblut für die Infektion von Hausschweinen mit Feldisolat 95/1279 zusammen.

Alle Absatzferkel zeigten über den Probenahmezeitraum stetig ansteigende KSPV-Titer im Blut (Abb. 5), der Spitzenwert lag bei  $5,6 \times 10^5$  KID<sub>50</sub>/ml (Tier 2105, 14. *d p.i.*).

Der Virusnachweis verlief in den Tonsillen und einem aus den übrigen entnommenen Organproben hergestellten Pool bei allen Absatzferkeln positiv. Entsprechend wurde auch in allen Knochenmarkausstrichen im IIFT Virus nachgewiesen (Tab. 3).

## 4. Ergebnisse

### 4.1.1.4. Serologie

Im Serum der Hausschweine ließen sich lediglich bei den Tieren 2101 und 2105 am 14. *d p.i.* anti-KSPV-Ak im ELISA nachweisen. Neutralisierende Ak im SNT wurden zu keinem Zeitpunkt detektiert.

**Tab. 2:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Blut- und Nasentupferproben der Hausschweine (Infektion mit Isolat 95/1279)

<i>d p.i.</i>	Tier 2101			Tier 2102			Tier 2103			Tier 2104			Tier 2105		
	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT
0	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg
3	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	n.d.	neg	neg	<b>pos</b>	neg	neg	neg	neg	neg	<b>pos</b>	neg
5	<b>pos</b>	n.d.	neg	<b>pos</b>	n.d.	neg	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	neg	<b>pos</b>	n.d.	neg
7	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
10	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
13	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
20	†19			†			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>pos</b> ,†	n.d.	<b>pos</b>

n.d.: Untersuchung nicht durchgeführt

neg: negatives Ergebnis

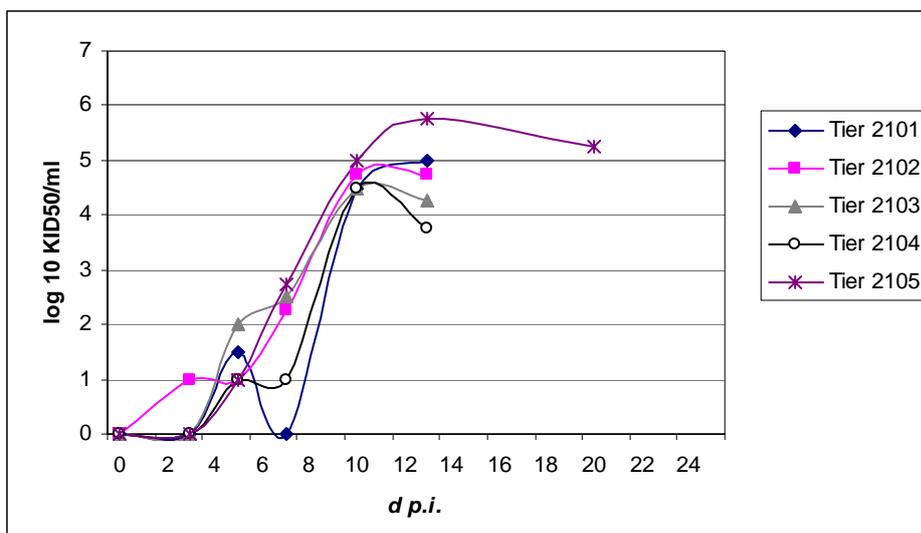
pos: positives Ergebnis

NT: Nasentupfer

VB: Vollblut

†19: Tier verendet bzw. getötet (*d p.i.* des Todeseintritts, wenn abweichend vom Tag der Probenahme)

**Abb. 5:** KSPV-Titer im Blut der Hausschweine nach Infektion mit Isolat 95/1279



**Tab. 3:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Organen der Hausschweine (Infektion mit Isolat 95/1279)

Organ	Tier 2101		Tier 2102		Tier 2103		Tier 2104		Tier 2105	
	VA	PCR								
Tonsille	<b>pos</b>	n.d.								
Pool (Milz, Mandibularlymphknoten, Intestinal- oder Lungenlymphknoten)	<b>pos</b>	n.d.								
Knochenmark (IIFT)	<b>pos</b>									

VA: Virusanzucht

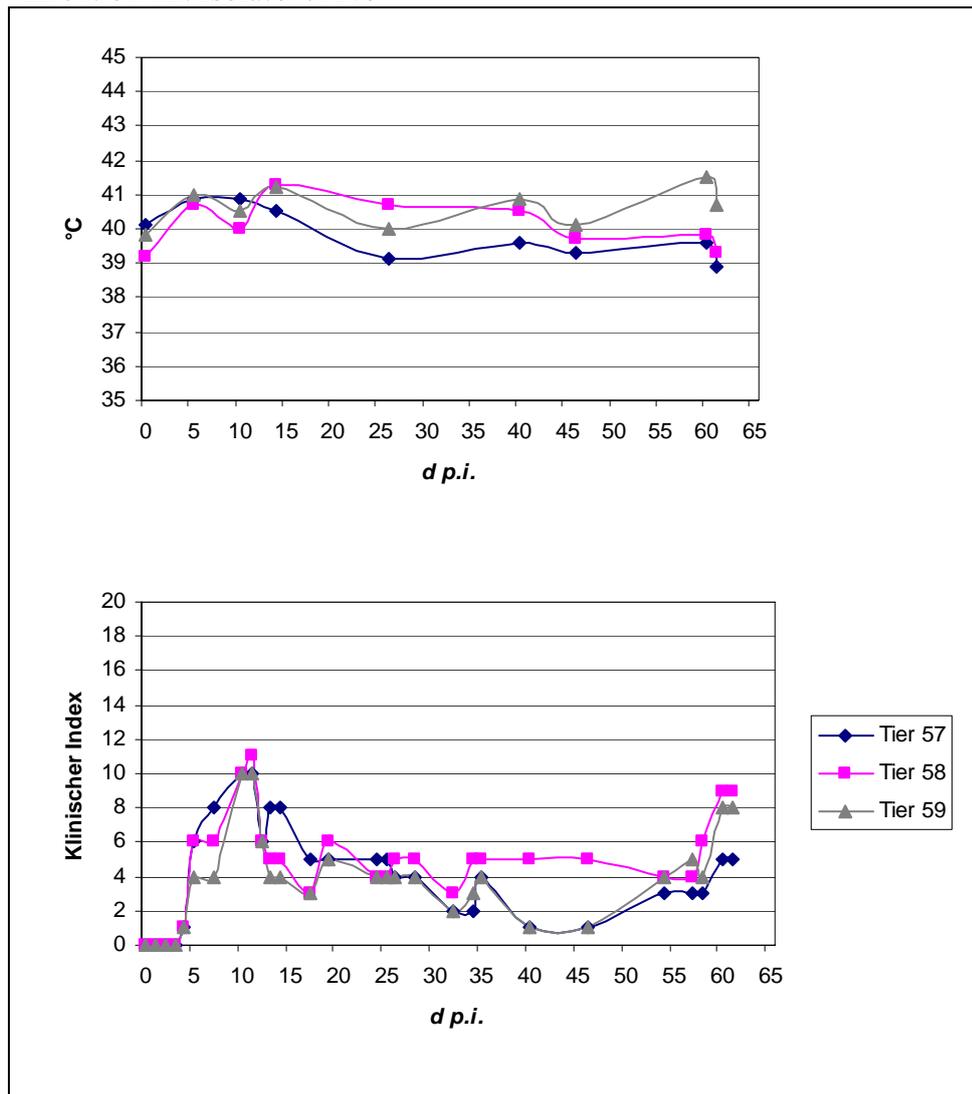
**4.1.2. Infektion von Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat 95/1279**4.1.2.1. Klinisches Bild

Die 3 mit dem Feldisolat 95/1279 infizierten Frischlinge wiesen einen von dem bei den Hausschweinen differenten klinischen Verlauf auf. Die Rektaltemperaturen lagen zwischen 39,1°C und 41,5°C, wobei sich ein Anstieg innerhalb der ersten 15 Tage des Versuchs verzeichnen ließ. Danach gingen die Werte bei 2 der 3 Tiere wieder zurück (Abb. 6). Ab dem 4. *d p.i.* war das Allgemeinbefinden aller Tiere eingeschränkt, zunächst gekennzeichnet durch verzögertes Aufstehen beim Betreten der Bucht durch Pflegepersonal. Später wurden die Tiere zunehmend apathischer und ließen sich liegend ohne Gegenwehr berühren, einhergehend mit eingeschränkter bis zeitweise völlig eingestellter Futteraufnahme und pumpender Atmung (Abb. 7). Herauszustellen ist eine sich ab dem 5. *d p.i.* entwickelnde mgr. bis hgr. Konjunktivitis mit starker Rötung und Schwellung der Bindehäute und schleimig-eitriger Exsudation (Abb. 7). Ab dem 15. *d p.i.* trat eine relative Besserung des Allgemeinbefindens ein, und die Tiere griffen die Bucht betretendes Personal wieder an. Im weiteren Versuchsverlauf schwankte die Vitalität zwischen geringer Einschränkung und stärkerer Apathie. Dies korrelierte offensichtlich auch mit dem Grad der Konjunktivitis, unter der besonders Tier 58 stark litt. Futter wurde zunehmend wieder im vor Versuchsbeginn üblichen Maße aufgenommen. Vom 50. *d p.i.* an zeigte sich bei Tier 59 breiiger Durchfall, der bis zum Versuchsende anhielt, das Tier wirkte insgesamt abgemagert und geschwächt. Bei Tier 58 setzte zu diesem Zeitpunkt Haarausfall im Bereich der distalen Extremitäten und der Rüsselscheibe ein (Abb. 7). Abb. 6 zeigt die klinischen Indices der einzelnen Tiere. Nach

## 4. Ergebnisse

einem Peak von 11 Punkten in der akuten Erkrankungsphase (10./11. *d p.i.*) pegelte sich der Index auf einen mittleren Wert von 5 ein und stieg erst gegen Ende des Experimentes wieder an. Am 61. *d p.i.* wurden die Tiere euthanasiert. Da keines der Tiere innerhalb von 2 Monaten nach der Infektion verendete, kann der hier vorliegende Krankheitsverlauf als chronisch bezeichnet werden.

**Abb. 6:** Rektaltemperaturverlauf (oben) und klinischer Index (unten) der Frischlinge nach Infektion mit Isolat 95/1279



**Abb. 7:** Hgr. Verminderung des Allgemeinbefindens (li.) und Konjunktivitis mit purulentem Augenausfluss sowie Haarausfall im Bereich der Rüsselscheibe (re.) bei den Frischlingen (Infektion mit Isolat 95/1279)



##### 4.1.2.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Die Frischlinge zeigten pathomorphologische Veränderungen in wesentlich geringerem Maße als die Hausschweine. Hervorstechendes Symptom bei allen 3 Tieren war die katarrhalische bis fibrinöse Konjunktivitis, in deren Begleitung die mandibulären Lymphknoten beidseits auf Junghenneneigröße geschwollen und abszediert waren (Abb. 8). Davon abgesehen wies Tier 59 als einziges zum Sektionszeitpunkt klinisch krankes Tier die am stärksten ausgeprägte Symptomatik auf. In den Bronchien fanden sich Lungenwürmer und in der Lunge multiple Wurmknötchen. Die Milz war durch multiple Randinfarkte, der Darm durch eine akute diffuse katarrhalische Gastroenteritis gekennzeichnet. Bei Tier 57 lagen mehrere unterschiedlich große Milzrandinfarkte, geschwollene Retropharyngeal- und Nierenlymphknoten sowie ein ggr. serofibrinöser Erguss in der Brusthöhle vor.

**Abb. 8:** Geschwollene und abszedierende Mandibularlymphknoten bei einem Frischling (Infektion mit Isolat 95/1279)



##### 4.1.2.3. Virusnachweis

Die Ergebnisse aus VA und PCR sind für die 3 Wildschweine in Tab. 4 dargestellt.

#### 4. Ergebnisse

**Tab. 4:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Blut- und Nasentupferproben der Wildschweine (Infektion mit Isolat 95/1279)

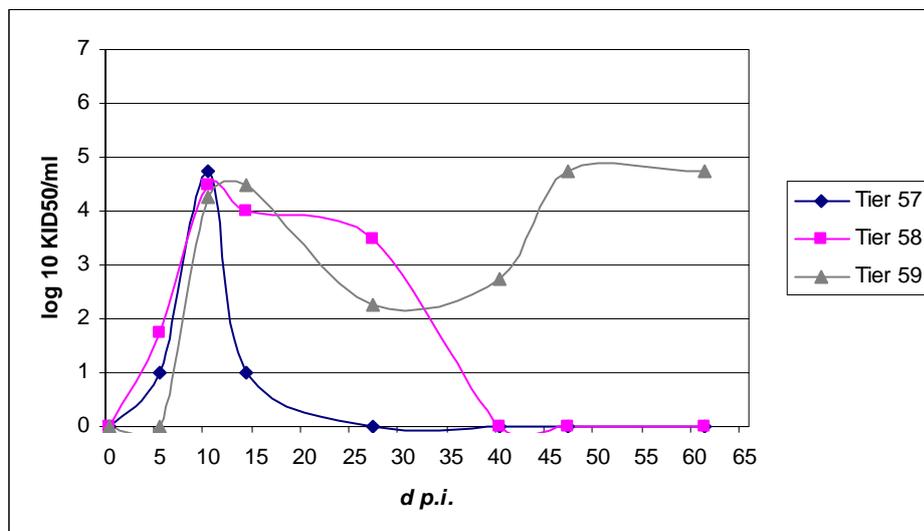
<i>d p.i.</i>	Tier 57			Tier 58			Tier 59		
	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT
0	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg
5	<b>pos</b>	n.d.	neg	<b>pos</b>	n.d.	neg	neg	<b>pos</b>	neg
10	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
14	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
27	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
40	neg	neg	neg	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
47	neg	neg	neg	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
61	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>

NT: Nasentupfer

VB: Vollblut

Bei den Frischlingen fielen die KSPV-Titer im Blut nach einem Peak am 10. *d p.i.* mit einem Titer von  $3,2 \times 10^4$  KID<sub>50</sub>/ml rasch wieder ab, wobei ab dem 40. *d p.i.* nur noch bei Tier 59 KSPV nachweisbar war. Bei diesem Tier stieg der Titer nach vorübergehendem Abfall gegen Ende des Versuchs wieder auf bis zu  $5,6 \times 10^4$  KID<sub>50</sub>/ml an. Insgesamt lag der höchste Virustiter im Blut der Wildschweine also um eine log 10-Stufe niedriger als im Blut der Hausschweine (Abb. 9).

**Abb. 9:** KSPV-Titer im Blut der Wildschweine nach Infektion mit Isolat 95/1279



#### 4. Ergebnisse

---

Die Untersuchung der Organe der Wildschweine lieferte bei den einzelnen Tieren uneinheitliche Ergebnisse, die in Tab. 5 zusammengefasst sind.

**Tab. 5:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Organen der Wildschweine (Infektion mit Isolat 95/1279)

Organ	Tier 57		Tier 58		Tier 59	
	VA	PCR	VA	PCR	VA	PCR
Tonsille	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.
Milz	neg	neg	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.
Mandibular- lymphknoten	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	n.d.
Intestinal- lymphknoten	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.
Lunge	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.
Knochenmark (IIFT)	<b>pos</b>		neg		<b>pos</b>	

##### 4.1.2.4. Serologie

Bei allen Wildschweinen konnte ab dem 14. *d p.i.* ein positives ELISA-Resultat verzeichnet werden, die Tiere 57 und 58 begannen ab diesem Zeitpunkt auch, neutralisierende Ak gegen KSPV in steigenden Titern zu produzieren (Abb. 10). Bei Tier 59 war das nicht der Fall, und hier sank auch der Ak-Titer im ELISA wieder ab (fragliches Ergebnis am 40. und 47. *d p.i.*, negatives Ergebnis am 61. *d p.i.*).

##### 4.1.3. **Infektion von Hausschweinen mit dem KSPV-Feldisolat E19/99**

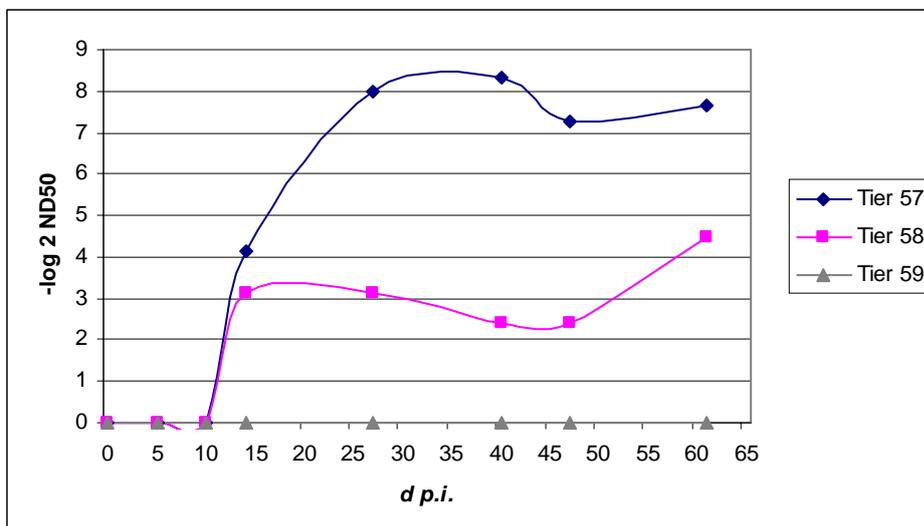
###### 4.1.3.1. Klinisches Bild

Ab dem 5. *d p.i.* lagen die Körpertemperaturen aller Hausschweine, die mit dem KSPV-Isolat E19/99 infiziert worden waren, über 40°C. Im Versuchsverlauf wurden Rektaltemperaturen bis über 42°C gemessen (Abb. 11). Erste klinische Symptome in Form von verminderter Vitalität, vermehrtem Liegen (Tiere 2116 und 2118) und mgr. verminderter Futteraufnahme traten am 8. *d p.i.* auf. In den folgenden Versuchstagen erschienen die Schweine jedoch ohne besonderen Befund (o.b.B.), und erst ab 13. *d p.i.* zeigte Tier 2119 wieder eine ggr. Verminderung des Allgemeinbefindens. Ferner waren die Ohren des Tieres gerötet. Vom

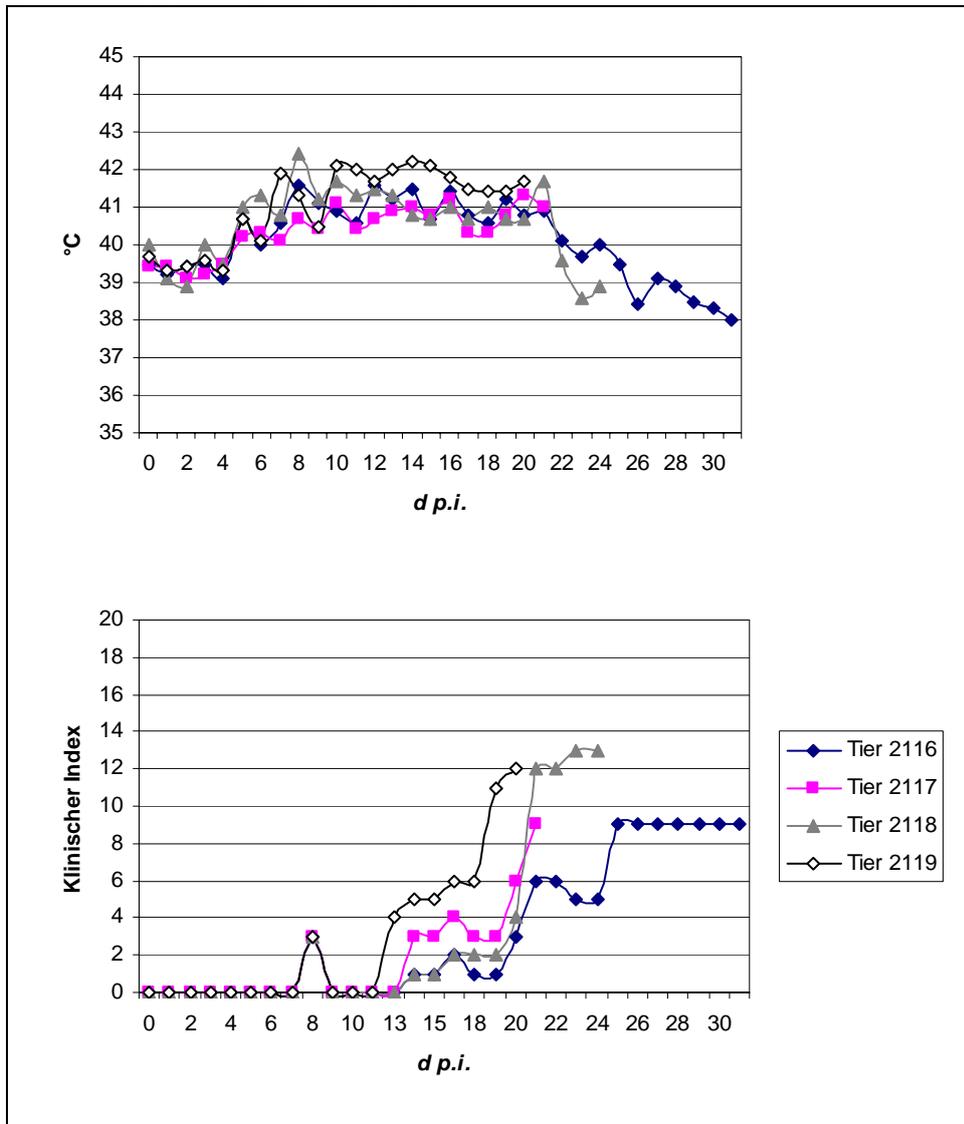
14. *d p.i.* an war die Lebhaftigkeit aller Schweine zunächst ggr., später stärker eingeschränkt, vor allem Tier 2119 nahm gleichzeitig auch weniger Futter auf und zeigte ab dem 15. *d p.i.* intermittierenden Durchfall. Ab 19. *d p.i.* waren bei diesem Tier auch pumpende und rasselnde Atmung und ab 20. *d p.i.* schwankender Gang zu beobachten. Es verendete am 21. *d p.i.* Die übrigen Hausschweine blieben ggr. im Allgemeinbefinden eingeschränkt, vom 20. *d p.i.* an wurde von allen mgr. weniger Futter aufgenommen. Nach weiterer Verschlechterung des Allgemeinbefindens und inzwischen völlig eingestellter Futteraufnahme bei allen Tieren verendete Tier 2117 am 22. *d p.i.* Bei den beiden verbleibenden Tieren sanken die Körpertemperaturen in den Folgetagen wieder auf Werte unter 40°C ab. Tier 2118 entwickelte petechiale Blutungen und später eine Blaufärbung der Haut im Bereich von Nase und Ohren. Außerdem zeigte es schwankenden Gang und verendete am 25. *d p.i.* Tier 2116 wies ab dem 25. *d p.i.* pumpende Atembewegungen auf und verendete schließlich am 32. *d p.i.* Die durchschnittliche Überlebensrate lag bei 25 Tagen, die Erkrankung verlief subakut.

Der klinische Index aller Versuchstiere stieg erst nach dem 17. *d p.i.* merklich an und erreichte einen Spitzenwert von 12 Punkten (Abb. 11).

**Abb. 10:** Verlauf der neutralisierenden Antikörpertiter bei den Wildschweinen nach Infektion mit Isolat 95/1279



**Abb. 11:** Rektaltemperaturverlauf (oben) und klinischer Index (unten) der Absatzferkel nach Infektion mit Isolat E19/99



#### 4.1.3.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Der Ernährungszustand der Tiere war kachektisch. Die Haut von Tier 2116 war im distalen Extremitätenbereich gelblich verfärbt, an den Klauen waren Dekubitusstellen unterschiedlicher Größe sichtbar. Die Mandibularlymphknoten aller Tiere waren mäßig geschwollen und blutig durchtränkt bis marmoriert. Die Tonsillen der Tiere 2118 und 2119 wiesen nekrotische Pfröpfe ggr. bis mgr. Ausmaßes auf. Die Herzen der Tiere 2117 und 2118 waren durch ausgedehnte subepikardiale Blutungen, das von Tier 2118 auch durch eine Pericarditis gekennzeichnet. An den Lungen aller Tiere wurde eine Pneumonie katarrhalischen bis kruppösen Charakters diagnostiziert, ggf. verbunden mit einer Pleuritis adhesiva (Tiere 2116 und 2118). Die für die KSP typischen petechialen Blutungen fanden

#### 4. Ergebnisse

---

sich auf den Nieren und Harnblasen aller Tiere. Die Milzen der Tiere 2116, 2117 und 2119 waren mäßig geschwollen. Die Tiere 2117 und 2119 hatten eine diphtheroide Kolitis. Bei den beiden anderen Tieren war lediglich die Darmschleimhaut diffus (Tier 2118) bzw. zirkumskript (Tier 2116) gerötet. Die Ileozäkalklappe von Tier 2116 wies nekrotische Pfröpfe auf.

##### 4.1.3.3. Virusnachweis

Die Tab. 6 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Untersuchungen auf KSPV in Blut- und Nasentupferproben der Absatzferkel.

**Tab. 6:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Blut- und Nasentupferproben der Hausschweine (Infektion mit Isolat E19/99)

<i>d p.i.</i>	Tier 2116			Tier 2117			Tier 2118			Tier 2119		
	BC	PCR VB	NT									
0	neg	n.d.	neg									
5	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	fragl	<b>pos</b>	neg	fragl	<b>pos</b>	<b>pos</b>
7	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>									
12	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>									
20	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>									

NT: Nasentupfer

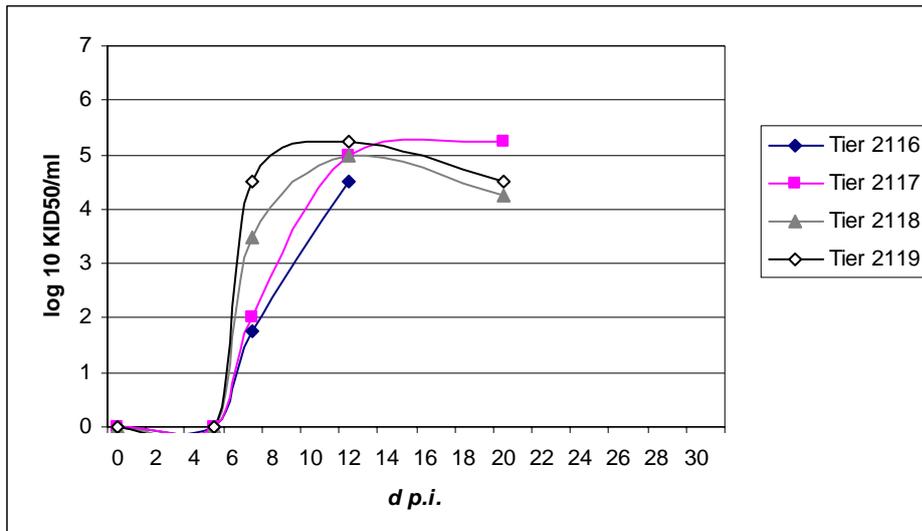
VB: Vollblut

fragl: fragliches Ergebnis

Bei allen infizierten Tieren stiegen die Virustiter im Blut im Versuchszeitraum stetig an (Abb. 12). Der höchste erreichte Titer betrug  $1,8 \times 10^5$  KID<sub>50</sub>/ml. Von Hausschwein 2116 lag für den 20. *d p.i.* kein Blut zur Titration vor.

##### 4.1.3.4. Serologie

In den Seren der Hausschweine waren sowohl im ELISA als auch im SNT zu keinem Zeitpunkt des Versuches Ak gegen KSPV nachweisbar.

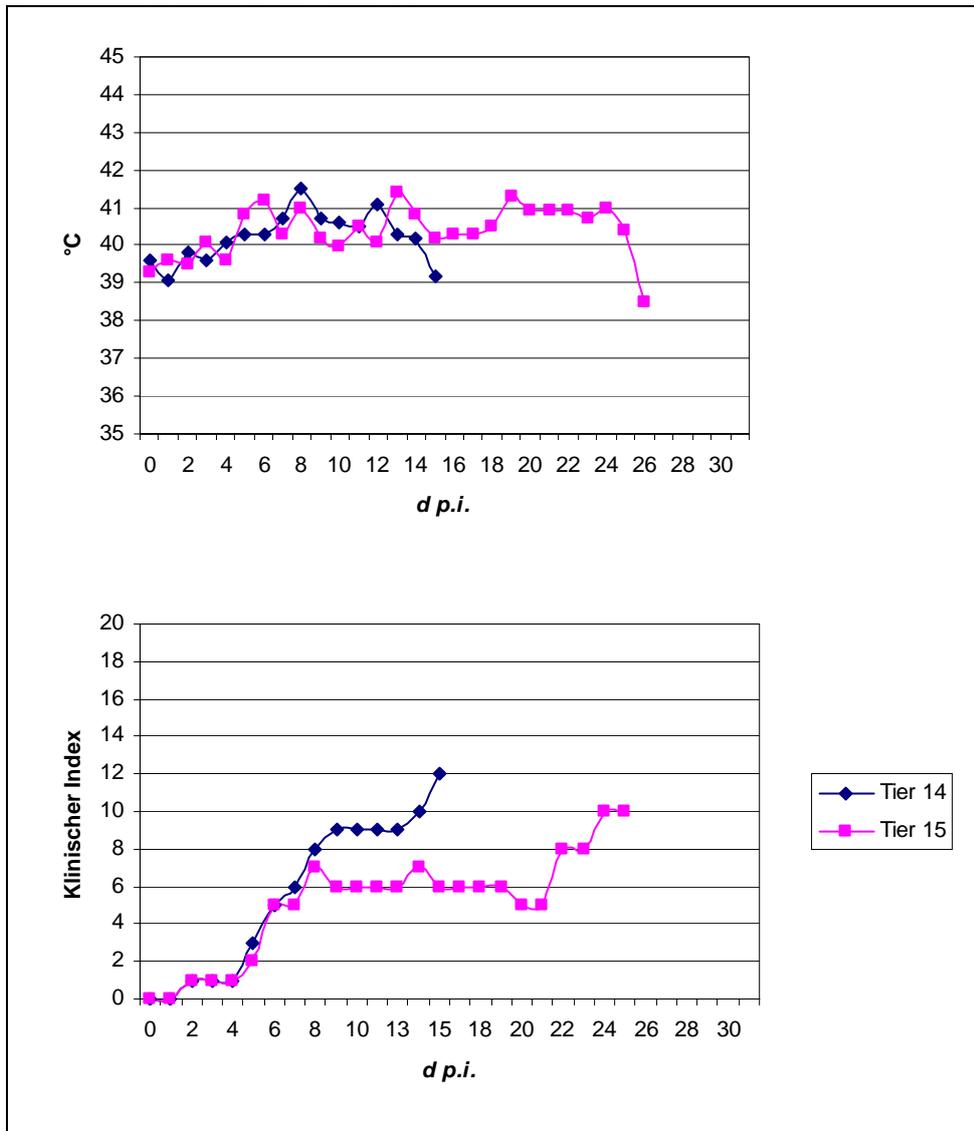
**Abb. 12:** KSPV-Titer im Blut der Hausschweine nach Infektion mit Isolat *E19/99*

#### 4.1.4. Infektion von Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat *E19/99*

##### 4.1.4.1. Klinisches Bild

Die beiden mit dem KSPV *E19/99* infizierten Frischlinge nahmen bereits ab dem 2. *d.p.i.* ggr. weniger Futter auf. Am 5. *d.p.i.* lag die Körpertemperatur beider Tiere erstmals über 40°C (Abb. 13), gleichzeitig standen sie verzögert auf und zeigten pumpende Atmung. In den Folgetagen verschlechterte sich das Allgemeinbefinden beider Tiere stetig, die Futtermittelaufnahme wurde völlig eingestellt, weiterhin war in sich verstärkendem Maße pumpende Atmung zu beobachten. Tier 14 lag ab dem 14. *d.p.i.* fest, entwickelte am 15. *d.p.i.* zusätzlich blutigen Durchfall und atmete stoßweise, verbunden mit blutigem Nasenausfluss. Das Tier verendete schließlich am 16. *d.p.i.* Tier 15 erholte sich zwischenzeitlich, zeigte sich weniger apathisch und nahm wieder etwas Futter auf. Die Atmung des Tieres war verbessert und nur noch ggr. pumpend. Ab dem 22. *d.p.i.* fraß das Tier jedoch wiederum nicht, die Atmungssymptomatik verstärkte sich, einhergehend mit zunehmender Apathie. Ab dem 24. *d.p.i.* war zusätzlich schwankender Gang zu beobachten. Das Tier verendete schließlich am 27. *d.p.i.*, nachdem seine Körpertemperatur auf unter 39°C abgesunken war. Die mittlere Überlebensrate der beiden Tiere lag bei 22 Tagen, was einem subakuten Erkrankungsverlauf entspricht. Die klinischen Indices lagen eine Woche *p.i.* bei 6 bzw. 9 und stiegen erst wenige Tage vor Todeseintritt auf 10 bzw. 12 Punkte an (Abb. 13).

**Abb. 13:** Rektaltemperaturverlauf (oben) und klinischer Index (unten) der Frischlinge nach Infektion mit Isolat *E19/99*



#### 4.1.4.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Beide Tiere wiesen einen kachektischen Ernährungszustand auf. Bei Tier 14 zeigten sich intramuskuläre Blutungen. Die Mandibularlymphknoten waren stark blutig durchtränkt und geschwollen, die Tonsillen ebenfalls blutig durchtränkt bzw. mit nekrotischen Pfröpfen versehen (Tier 15). Das Herz von Tier 15 wies ausgedehnte subepikardiale Blutungen auf. Beide Tiere hatten eine katarrhalische bis kruppöse Pneumonie. Außerdem wies die Pleura costalis bei Tier 14 feine spritzerartige Blutungen auf. Petechien waren am Herzen und subserös im Bereich des Jejunums (Tier 14) bzw. an Niere und Harnblase (Tier 15) sichtbar. Tier 14 hatte eine katarrhalische Jejunitis, beide Tiere eine diphtheroide Kolitis im Bereich der Ileoözäkalklappe.

## 4. Ergebnisse

---

In einer nachfolgenden bakteriologischen Untersuchung wurde aus dem Lungengewebe des Tieres 15 *Pasteurella multocida* isoliert.

### 4.1.4.3. Virusnachweis

Die Resultate der Untersuchungen auf KSPV in Blut- und Nasentupferproben der Wildschweine sind in Tab. 7 dargestellt.

**Tab. 7:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Blut- und Nasentupferproben der Wildschweine (Infektion mit Isolat E19/99)

<i>d p.i.</i>	Tier 14			Tier 15		
	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT
0	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg
5	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	neg
7	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
12	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
20	† 16			<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>

NT: Nasentupfer

VB: Vollblut

† 16: Tier verendet (*d p.i.* des Todeseintritts)

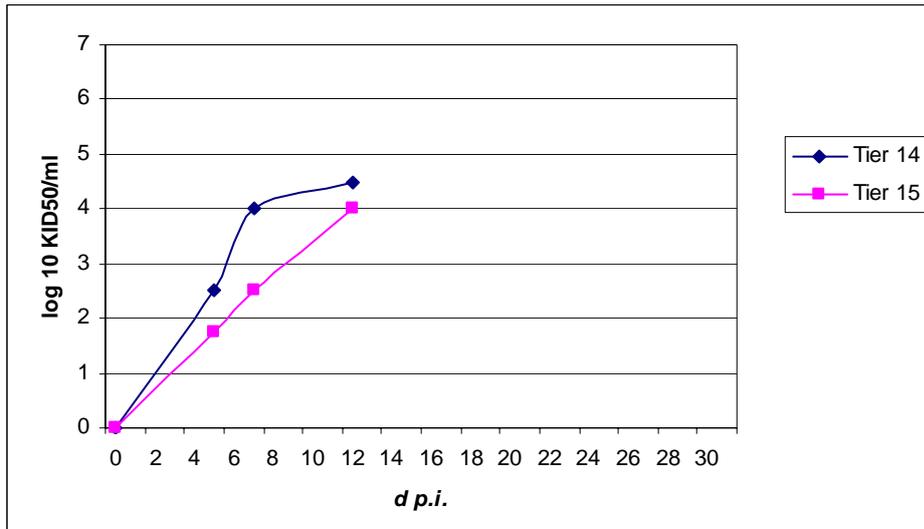
Auch bei den infizierten Wildschweinen war eine stete Zunahme des Virustiters im Blut zu verzeichnen. Der höchste erreichte Titer lag hier mit  $3,2 \times 10^4$  KID<sub>50</sub>/ml nur wenig niedriger als bei den Hausschweinen. Vom Wildschwein Nr. 15 lag für den 20. *d p.i.* nicht genügend Blut zur Titration vor, weshalb kein Wert ermittelt werden konnte (Abb. 14).

Von den beiden Wildschweinen wurden Proben von Tonsille, Mandibular- und Intestinallymphknoten, Milz und Niere entnommen und im Pool angerieben. Die VA auf PK-15-Zellen lieferte in beiden Fällen ein negatives Ergebnis. In der daraufhin durchgeführten n-PCR waren beide Organpools positiv (Tab. 8).

### 4.1.4.4. Serologie

Bei Wildschwein Nr. 14 erbrachte der ELISA am 12. *d p.i.* und bei Nr. 15 am 20. *d p.i.* ein positives Resultat. Im SNT wurden am 12. bzw. am 12. und am 20. *d p.i.* entsprechende neutralisierende Ak-Titer ermittelt (Abb. 15).

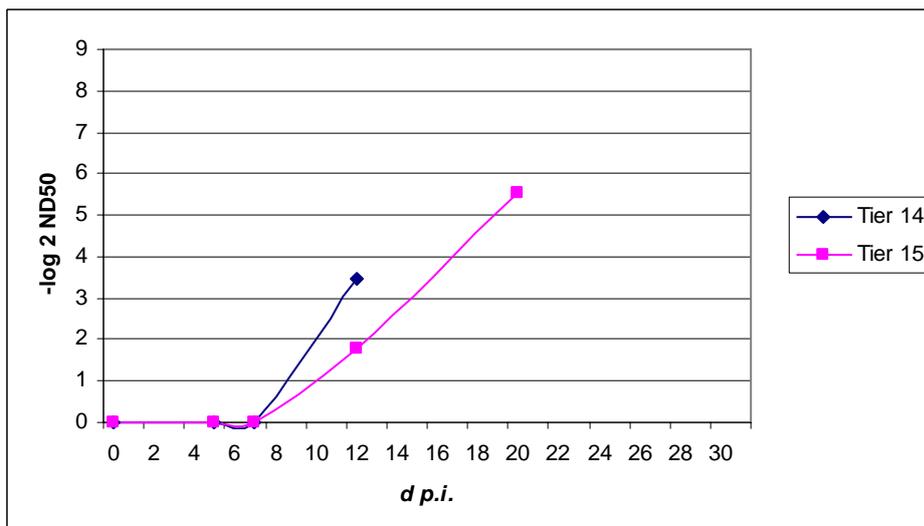
**Abb. 14:** KSPV-Titer im Blut der Wildschweine nach Infektion mit Isolat *E19/99*



**Tab. 8:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Organen der Wildschweine (Infektion mit Isolat *E19/99*)

Organ	Tier 14		Tier 15	
	VA	PCR	VA	PCR
Pool (Tonsille, Milz, Niere, Mandibular- und Intestinallymphknoten)	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>

**Abb. 15:** Verlauf der neutralisierenden Antikörpertiter bei den Wildschweinen nach Infektion mit Isolat *E19/99*



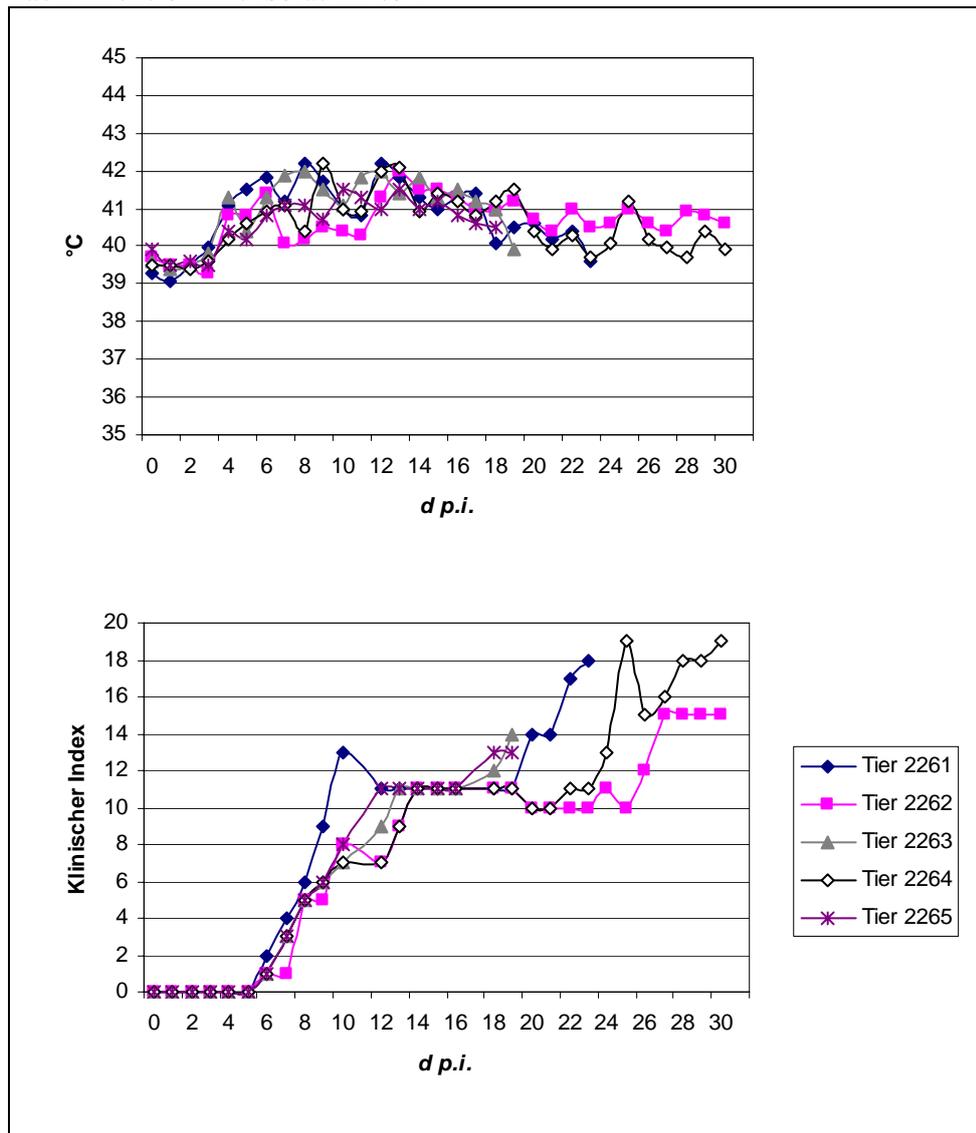
### 4.1.5. Infektion von Hausschweinen mit dem KSPV-Feldisolat E15/98

#### 4.1.5.1. Klinisches Bild

Bei den fünf infizierten Absatzferkeln wurden erstmals am 4. *d p.i.* Körpertemperaturen von über 40°C bzw. 41°C ermittelt (Abb. 16). Am 7. *d p.i.* standen die Tiere nur zögernd auf. Die Futteraufnahme war ggr. eingeschränkt, und die Tiere zeigten schleimigen Nasenausfluss. Dieser verstärkte sich in den nächsten Tagen, war nun von schleimig-eitriger Konsistenz und begleitet von schniefender Atmung. Allgemeinbefinden und Futteraufnahme waren ab dem 10. *d p.i.* stärker eingeschränkt, ab dem 12. *d p.i.* hatten alle Tiere dünnbreiigen Durchfall und ein gesträubtes Haarkleid. Die Tiere 2263 und 2265 lagen vom 18. *d p.i.* an fest, Tier 2263 zeigte pumpende Atembewegungen und Husten, und die Hautoberfläche beider Tiere wies fleckige Rötungen auf. Tier 2265 verendete am 19. *d p.i.*, Tier 2263 am 20. *d p.i.* Tier 2261 war ab dem 21. *d p.i.* festliegend, nachdem es am Tag zuvor bereits eine Hinterhandschwäche hatte. Es zitterte, zeigte Krampfstörungen und Ruderbewegungen und stellte seine Futteraufnahme völlig ein, bevor es am 24. *d p.i.* verendete. Bei den verbleibenden Tieren waren das Allgemeinbefinden und die Nahrungsaufnahme in den folgenden Tagen zunehmend eingeschränkt (ab 28. *d p.i.* Festliegen beider Tiere), auch hier stellten sich pumpende Atmung und Husten ein. Tier 2264 zeigte ab dem 25. *d p.i.* schwankenden Gang und eine Schwäche der Hinterhand. Weitere Symptome bei beiden Tieren waren wässriger Durchfall, gesträubtes Haarkleid und fleckige Rötung der Haut und zunehmend mukopurulenter Nasen- und Augenausfluss. Die Schweine wurden am 31. *d p.i.* euthanasiert. Die durchschnittliche Überlebensrate bei den gestorbenen Tieren betrug 21 Tage, die Mortalität lag bis zum 31. *d p.i.* bei 60%. Somit lag ein subakuter bis chronischer Erkrankungsverlauf vor.

Der klinische Index erreichte ab 14. *d p.i.* bei allen Versuchstieren einen Wert von mehr als 10 Punkten und insgesamt einen Spitzenwert von 19 Punkten (Tier 2264; Abb. 16)

**Abb. 16:** Rektaltemperaturverlauf (oben) und klinischer Index (unten) der Absatzferkel nach Infektion mit Isolat *E15/98*



#### 4.1.5.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Tier 2264 war zum Zeitpunkt der Tötung bereits stark abgemagert. Die Haut der Tiere 2263 und 2265 war durch Petechien bzw. großflächigere Unterhautblutungen gekennzeichnet. Beide Tiere hatten zyanotische Akren und Ohrtrandnekrosen. Die Gliedmaßen der Tiere 2262 und 2264 wiesen zahlreiche Dekubitusstellen auf.

Alle fünf Tiere zeigten bei der Sektion pathologisch-anatomische Veränderungen an den Lungen. Es handelte sich dabei um katarrhalisch-eitrige (Tiere 2262, 2263 und 2265) bis nekrotisierende Pneumonien (Tiere 2261 und 2264). Tier 2262 hatte außerdem eine eitrige Bronchitis, Tier 2264 eine chronisch-fibroplastische Pleuritis. Die Tonsillen von Tier 2265 waren gerötet, die der Tiere 2262 und 2263 mit Nekroseherden versehen. Die Mandibular- und Darmbeinlymphknoten, bei Tier 2261 auch die Mediastinallymphknoten waren blutig

#### 4. Ergebnisse

durchtränkt bis marmoriert und geschwollen. Die Nieren des Tieres 2263 wiesen petechiale Blutungen auf. Tier 2265 hatte ein ausgeprägtes Magenwandödem mit Einblutung. Bei Tier 2261 wurde eine katarrhalische Enteritis diagnostiziert, bei Tier 2264 diphtheroidnekrotisierende Entzündungsherde an den Lymphfollikeln des Ileums und der Ileozäkalklappe. Die Serosen der Bauchhöhle waren bei Tier 2265 mit petechialen Blutungen versehen.

##### 4.1.5.3. Virusnachweis

In Tab. 9 sind die Ergebnisse von VA und PCR-Untersuchungen mit BC-Zellen, Vollblut- und Nasentupferproben dargestellt.

**Tab. 9** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Blut- und Nasentupferproben der Hausschweine (Infektion mit Isolat *E15/98*)

<i>d</i>	Tier 2261			Tier 2262			Tier 2263			Tier 2264			Tier 2265		
	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT
0	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg
3	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	neg	neg	<b>pos</b>	neg	neg	neg	neg	<b>pos</b>	n.d.	neg
5	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	neg	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
7	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
10	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
14	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
21	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	†20			<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	†19		
31	†24			<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>				<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>			

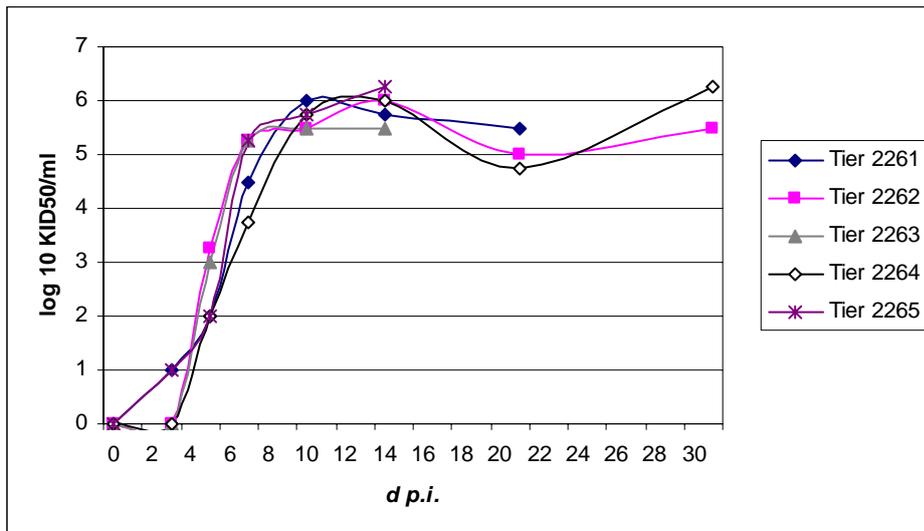
NT: Nasentupfer

VB: Vollblut

†24: Tier verendet (*d p.i.* des Todeseintritts)

Die Virustiter im Blut aller Hausschweine des Versuches stiegen in den ersten 14 Tagen nach der Infektion kontinuierlich an und erreichten dann ein Plateau, wobei sich die Titer bis zum Versuchsende bzw. bis zum Tod des jeweiligen Tieres zwischen  $5,6 \times 10^4$  KID<sub>50</sub>/ml und  $1,8 \times 10^6$  KID<sub>50</sub>/ml Vollblut bewegten (Abb. 17).

**Abb. 17:** KSPV-Titer im Blut der Hausschweine nach Infektion mit Isolat *E15/98*



Der Virusnachweis in der VA konnte bei allen Absatzferkeln sowohl aus den Tonsillen als auch aus einem Pool der übrigen Organproben geführt werden. Der IIFT am Knochenmarkausstrich verlief bei Tier 2261 negativ, bei den 4 anderen Tieren wurde KSPV-Antigen nachgewiesen (Tab. 10).

**Tab. 10:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in Organen der Hausschweine (Infektion mit Isolat *E15/98*)

Organ	Tier 2261		Tier 2262		Tier 2263		Tier 2264		Tier 2265	
	VA	PCR								
Tonsille	<b>pos</b>	n.d.								
Pool (Milz, Mandibularlymphknoten, Intestinal- oder Lungenlymphknoten)	<b>pos</b>	n.d.								
Knochenmark (IIFT)	neg		<b>pos</b>		<b>pos</b>		<b>pos</b>		<b>pos</b>	

#### 4.1.5.4. Serologie

Im CHEKIT CSF-Sero-ELISA reagierten die Seren der Absatzferkel 2262 und 2264 vom 21. *d p.i.* und 2265 vom 14. *d p.i.* fraglich. Entsprechende neutralisierende Ak wurden bei keinem der Absatzferkel detektiert.

### 4.1.6. Infektion von Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat *E15/98*

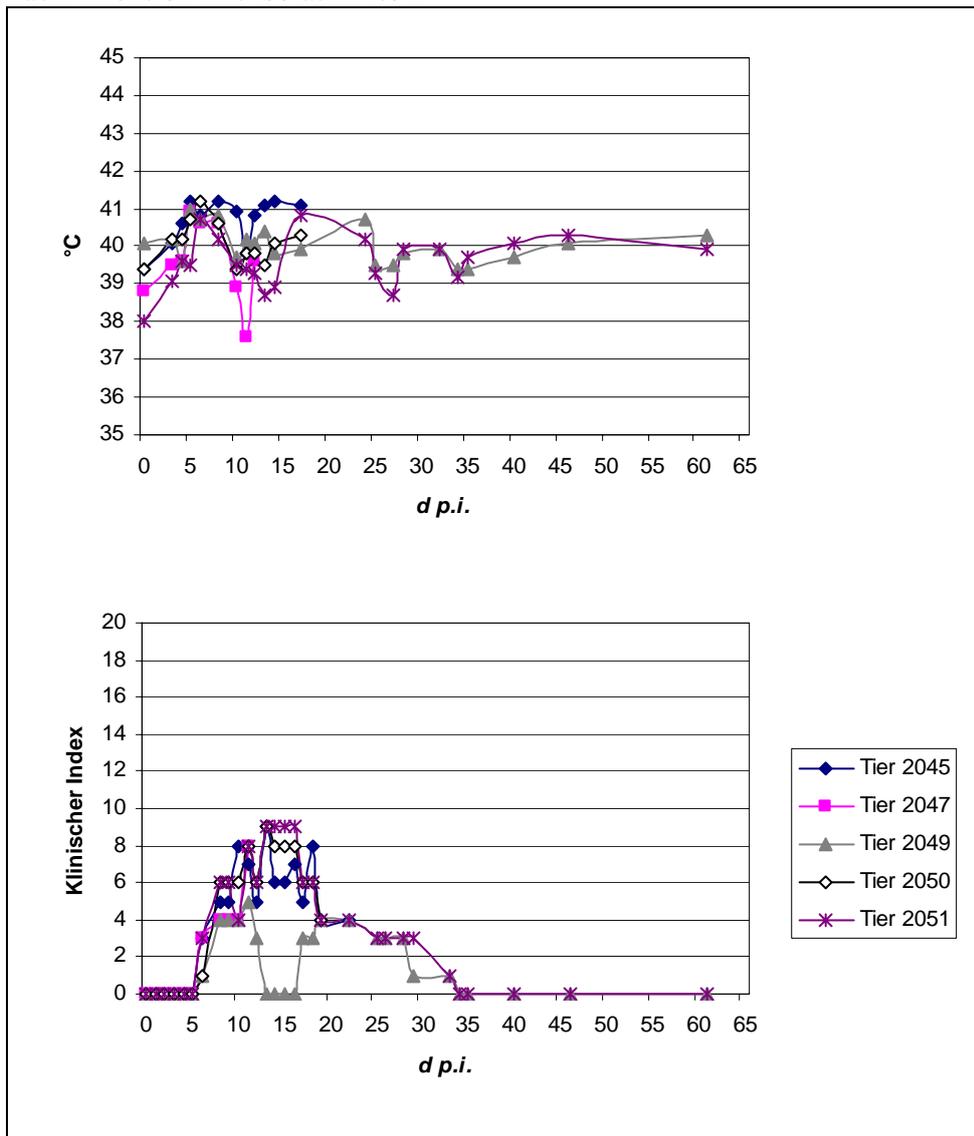
#### 4.1.6.1. Klinisches Bild

Die sich in ihrer körperlichen Konstitution stark unterscheidenden fünf Wildschweine im Versuch zeigten auch im Erkrankungsverlauf Differenzen, die jedoch nicht in jedem Fall mit einem stärkeren oder schwächeren Körperbau korrelierten. Innerhalb der ersten 1 bis 2 Wochen nach Infektion war bei allen Tieren ein Anstieg der Rektaltemperaturen um 1 K bis 2 K zu verzeichnen. Bis zum 24. *d p.i.* waren 3 der 5 Tiere verendet, bei den 2 verbleibenden Wildschweinen schwankten die Temperaturen nur noch in geringem Maße um den Normalbereich (Abb. 18).

Erste klinische Erscheinungen waren am 6. *d p.i.* zu verzeichnen. Alle Tiere zeigten eine herabgesetzte Vitalität. Tier 2045 atmete pumpend, die Tiere 2047 und 2051 hatten breiigen Durchfall. 2 Tage später nahmen alle Wildschweine außerdem weniger Futter auf, erhoben sich erst bei unmittelbarer Annäherung von Pflegepersonal und legten sich nach kurzer Zeit wieder ab. Auch Tier 2050 hatte jetzt Durchfall. Bei Tier 2045 war eine Rötung der Konjunktiven sichtbar. Am 10. *d p.i.* zeigten einige Tiere wässrige Diarrhoe, Tier 2045 hatte mukösen Augenausfluss. Am Folgetag nahmen alle Schweine kein Futter mehr auf. Die Tiere 2047, 2050 und 2051 hatten wässrigen Durchfall. Das erstgenannte Tier zeigte außerdem starke Apathie und war exsikkotisch. Seine Körpertemperatur war inzwischen unter 38°C abgefallen. Es verendete am Folgetag. Allgemeinbefinden und Futteraufnahme aller anderen Tiere blieben in den nächsten Tagen mgr. bis hgr. eingeschränkt. Auch die Durchfallsymptomatik setzte sich fort. Die am geringsten ausgeprägten Krankheitssymptome wies Tier 2049 auf, das größte Tier der Gruppe. Am 22. *d p.i.* verendete Tier 2050, am 24. *d p.i.* Tier 2045. Die beiden verbleibenden Wildschweine erholten sich zusehends, und ab 34. *d p.i.* waren bis zum Ende des Experiments nach 61 Tagen keine klinischen Symptome mehr zu verzeichnen. Abb. 18 gibt einen Überblick über die im Infektionsversuch mit Feldisolat *E15/98* ermittelten klinischen Indices. Sie erreichten außer bei Tier 2049 Werte bis 9 in der Phase zwischen 2 und 3 Wochen nach erfolgter Infektion und sanken bei den überlebenden Tieren später bis auf 0 ab.

Die durchschnittliche Überlebensrate der Tiere in diesem Versuch lag bei 20 Tagen, die Mortalität insgesamt bei 60%. Es handelte sich um einen akuten bis subakuten bzw. akut-transienten Erkrankungsverlauf.

**Abb. 18:** Rektaltemperaturverlauf (oben) und klinischer Index (unten) der Frischlinge nach Infektion mit Isolat *E15/98*



#### 4.1.6.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Die 3 verendeten Tiere (Tiere 2045, 2047 und 2050) waren hgr. kachektisch, das Tier 2047 außerdem mgr. exsikkotisch. Alle 3 Tiere hatten eine katarrhalische Bronchopneumonie. Die Mandibularlymphknoten waren blutig durchtränkt bis marmoriert (Tier 2047). Mehrere Gewebe und Organe wiesen die KSP-typischen Petechien auf (Tier 2045: Kehildeckel, Herz, Niere; Tier 2050: Harnblase). Weiterhin wurde bei Tier 2045 eine hämorrhagische Kolitis, bei Tier 2047 eine akute hämorrhagische Gastritis und bei Tier 2050 eine ggr. katarrhalische Kolitis diagnostiziert.

Die beiden überlebenden Tiere (Tiere 2049 und 2051) waren pathomorphologisch weitgehend o.b.B., lediglich die Lunge des Tieres 2051 war fleckig hellgrau- bis rosarot gefärbt und das

## 4. Ergebnisse

Lungengewebe herdförmig verdichtet. In der Brusthöhle befand sich ein ggr. serofibrinöser Erguß.

### 4.1.6.3. Virusnachweis

Die Resultate der an BC-Zellen, Vollblut- und Nasentupferproben durchgeführten virologischen Untersuchungen sind für die mit *E15/98* infizierten Wildschweine in Tab. 11 zusammengefasst.

**Tab. 11:** Nachweis von KSPV/ -Antigen in Blut- und Nasentupferproben der Wildschweine (Infektion mit Isolat *E15/98*)

<i>d</i>	Tier 2045			Tier 2047			Tier 2049			Tier 2050			Tier 2051		
	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT	BC	PCR VB	NT
0	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	n.d.	neg
5	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	neg
10	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>
14	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	†12			<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	neg	neg	<b>pos</b>
27	†24						neg	<b>pos</b>	neg	†22			neg	neg	neg
40							neg	<b>pos</b>	neg				neg	<b>pos</b>	neg
46							neg	<b>pos</b>	neg				neg	<b>pos</b>	neg
61							neg	neg	neg				neg	<b>pos</b>	neg

NT: Nasentupfer

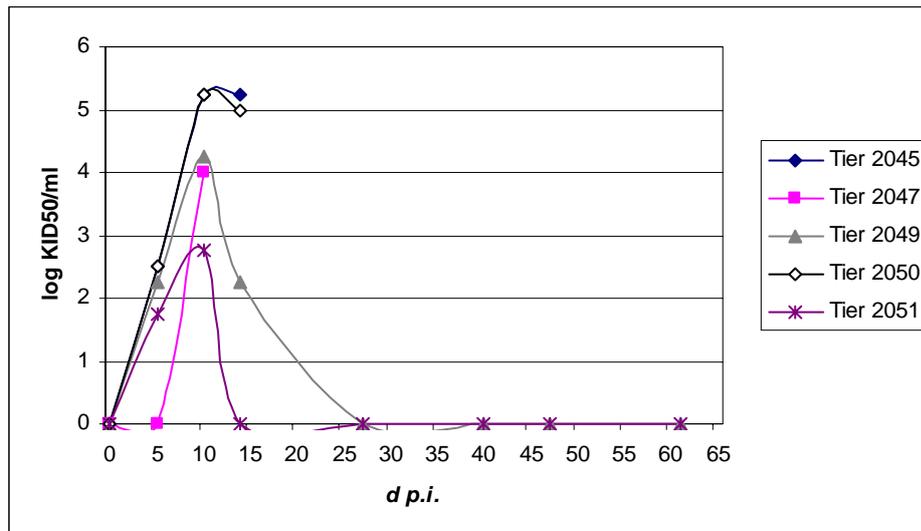
VB: Vollblut

†24: Tier verendet (*d p.i.* des Todeseintritts)

Bei den Wildschweinen wurden die höchsten Virustiter im Blut ebenso wie bei den Hausschweinen 10 *d p.i.* bzw. 14 *d p.i.* erreicht, blieben jedoch für 3 der 5 Tiere unter den dort ermittelten Werten. Danach fielen die Titer bei den beiden überlebenden Tieren schnell wieder bis unter die Nachweisgrenze ab (Abb. 19).

Die Organe der 3 verendeten Wildschweine (Tiere 2045, 2047 und 2050) wurden nach demselben Schema wie die der Hausschweine untersucht. Auch bei den Wildschweinen wurde in Tonsillen, Organpools und im Knochenmarkausstrich KSPV bzw. -Antigen nachgewiesen (Tab. 12). Bei den überlebenden Wildschweinen kamen alle entnommenen Organproben einzeln zur Untersuchung (Tab. 13).

**Abb. 19:** KSPV-Titer im Blut der Wildschweine nach Infektion mit Isolat *E15/98*



**Tab. 12:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in den Organen der Wildschweine 2045, 2047 und 2050 (Infektion mit Isolat *E15/98*)

Organ	Tier 2045		Tier 2047		Tier 2050	
	VA	PCR	VA	PCR	VA	PCR
Tonsille	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	n.d.
Pool (Milz, Mandibularlymphknoten, Intestinal- oder Lungenlymphknoten)	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	n.d.	<b>pos</b>	n.d.
Knochenmark (IIFT)	<b>pos</b>		<b>pos</b>		<b>pos</b>	

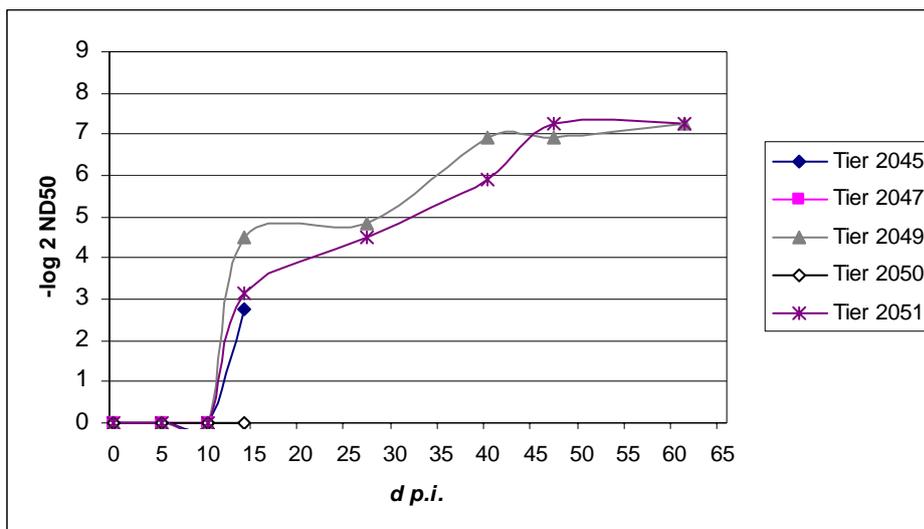
**Tab. 13:** Nachweis von KSPV/-Sequenzen in den Organen der Wildschweine 2049 und 2051 (Infektion mit Isolat *E15/98*)

Organ	Tier 2049		Tier 2051	
	VA	PCR	VA	PCR
Tonsille	neg	<b>pos</b>	neg	neg
Milz	neg	<b>pos</b>	neg	neg
Mandibularlymphknoten	neg	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>
Intestinallymphknoten	neg	<b>pos</b>	neg	neg
Lunge	neg	neg	neg	neg
Knochenmark (IIFT)	neg		neg	

### 4.1.6.4. Serologie

Die Seren der Wildschweine mit Ausnahme von Tier 2047 reagierten ab dem 10. *d p.i.* (Tier 2049) bzw. ab dem 14. *d p.i.* (Tiere 2045, 2050 und 2051) positiv im ELISA. Ab dem 14. *d p.i.* wurden bei 3 der bis zu diesem Zeitpunkt überlebenden Tiere neutralisierende Ak detektiert, deren Titer im weiteren Versuchsverlauf anstiegen (Abb. 20).

**Abb. 20:** Verlauf der neutralisierenden Antikörpertiter bei den Wildschweinen nach Infektion mit Isolat *E15/98*



## 4.2. Laborexperimentelle Studien

### 4.2.1. Ein-Schritt-Wachstumskinetiken

#### 4.2.1.1. Titerverhältnis zwischen zellgebundenem und zellfreiem Virus

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Wachstumsverhalten in Zellkultur und der Virulenz der KSPV-Stämme und -Isolate besteht, wurden Wachstumskinetiken erstellt. Laut Mittelholzer *et al.* (2000) wird von KSPV mit hoher Virulenz vergleichsweise mehr Virus in den ZKÜ abgegeben als bei moderat- oder geringvirulenten KSPV, bei denen ein größerer Anteil der synthetisierten Virionen zellgebunden bleiben soll.

##### 4.2.1.1.1. *KSPV-Laborstämme (Genotyp 1.1)*

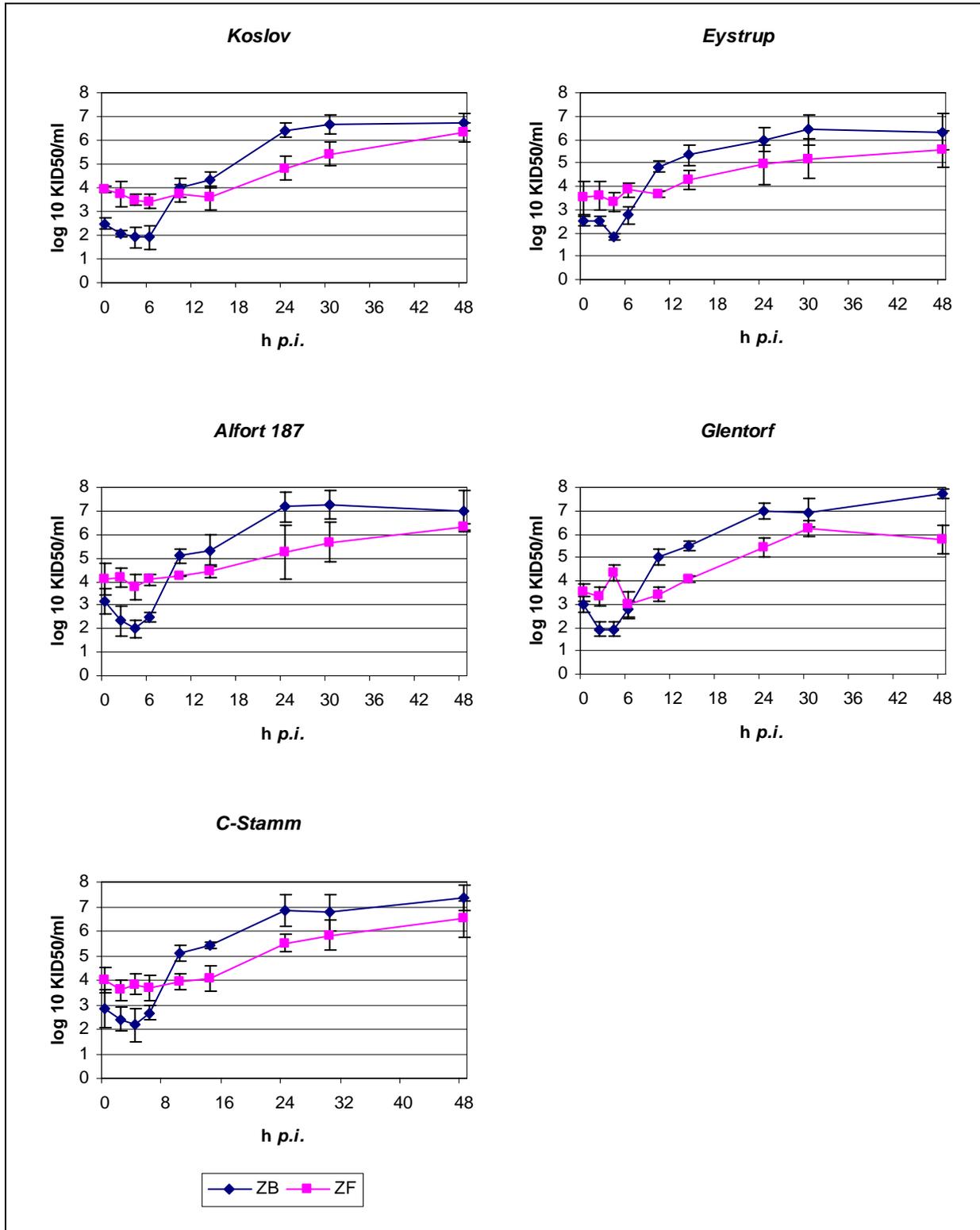
Alle verwendeten Laborstämme stellen ältere KSPV-Isolate dar, die heute nicht mehr im Feld nachgewiesen werden und zum Genotyp 1.1. gehören. Die Wachstumskurven sind in Abb. 21 dargestellt. Die während der ersten 6 h nach Beginn der Virusvermehrung in der ZK

festgestellten abfallenden Virustiter kommen durch den Eintritt der Viren in die Zellen und das darauf folgende *Uncoating* der Virus-RNA zustande (Mittelholzer *et al.*, 2000). Zum Probenahmezeitpunkt 10 h *p.i.* war bei allen Laborstämmen erstmals ein Titeranstieg des zellassozierten Virus zu beobachten, was den Beginn der Synthese neuer Virionen markiert. Deshalb wurden alle ab diesem Termin ermittelten Virustiter in die Berechnung des mittleren Titers des jeweiligen Kompartimentes einbezogen. Ein weiterer Titeranstieg bis 24 bzw. 30 h *p.i.* war bei allen Stämmen zu verzeichnen, danach wurde ein Plateau erreicht, in dem nur mitunter noch geringe Titeranstiege zu erwarten waren. Die Endtiter des zellassozierten Virus lagen zwischen  $2,1 \times 10^6$  und  $5,6 \times 10^7$  KID<sub>50</sub>/ml. Die zellfreien Virustiter stiegen vergleichsweise weniger steil an, und bei allen getesteten Laborstämmen lagen die Kurven unter denen des zellgebundenen Virus. Folglich ergaben sich bei Berechnung des Index aus den mittleren Virustitern (s. 3.12.1.5) für alle Laborstämme negative Zahlenwerte (Abb. 22).

### 4.2.1.1.2. KSPV-Feldisolate (Genotyp 2.3)

Alle verwendeten Isolate wurden 1995 oder später aus Wildschweinen isoliert und gehören zum Genotyp 2.3. Ihre Wachstumskurven sind in Abb. 23 dargestellt. Auch bei den Feldisolaten war 10 h *p.i.* erstmals ein Anstieg des zellgebundenen Virustiters zu verzeichnen, doch fiel dieser im Vergleich zu den Laborstämmen geringer aus. Im Gegensatz zu diesen überschritt der zellgebundene Virustiter zu diesem Zeitpunkt nicht den des zellfreien Virus. Auch im weiteren Verlauf der Kinetiken stieg der Titer des zellgebundenen Virus weniger stark an als bei den Laborstämmen. Er übertraf nur geringfügig bzw. erst zu einem späteren Zeitpunkt den Titer im ZKÜ. Die Endtiter des zellgebundenen Virus blieben mit  $1,8 \times 10^5$  bis  $3,8 \times 10^6$  KID<sub>50</sub>/ml hinter denen der KSPV-Laborstämme (Genotyp 1.1) zurück. Die Titerentwicklung im ZKÜ (zellfreies Virus) war vergleichbar mit der bei den Laborstämmen. Das Wachstumsplateau wurde ebenfalls 24 bis 30 h *p.i.* erreicht. Eine Ausnahme bildete nur das Isolat *Spante*, bei dem der Virusgehalt beider Kompartimente bis zur letzten Probenahme 48 h *p.i.* anstieg. Die Indices aus den mittleren Titern lagen im negativen Bereich nahe 0 bzw. im positiven Bereich (Abb. 24).

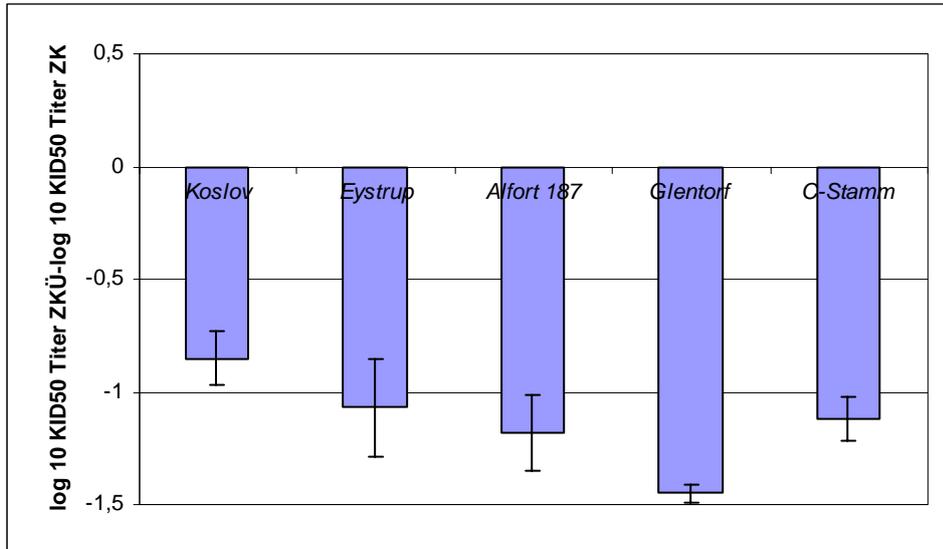
**Abb. 21:** Ein-Schritt-Wachstumskurven der KSPV-Laborstämme



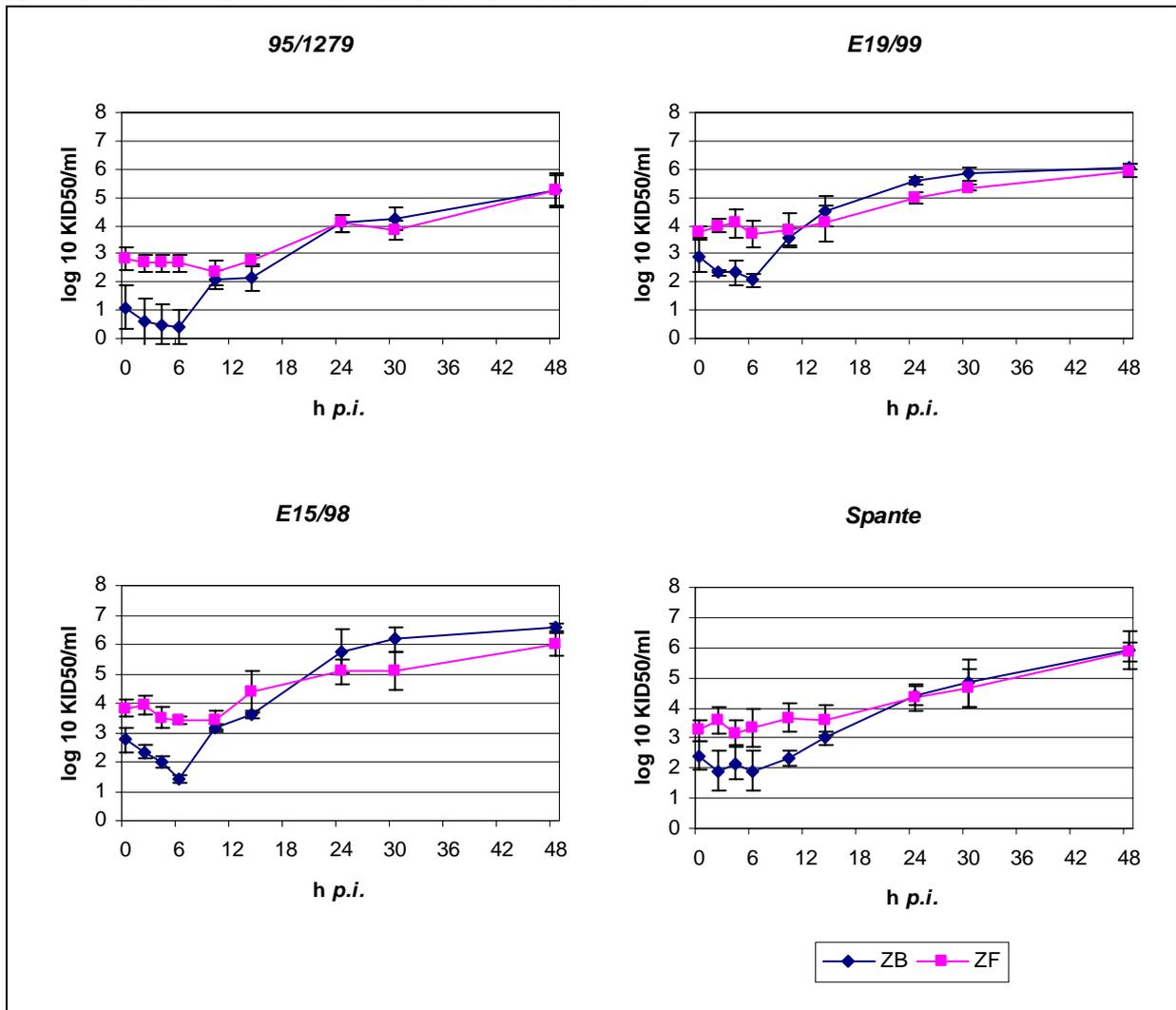
ZB: zellgebundenes Virus  
 ZF: zellfreies Virus (Virus im ZKÜ)

#### 4. Ergebnisse

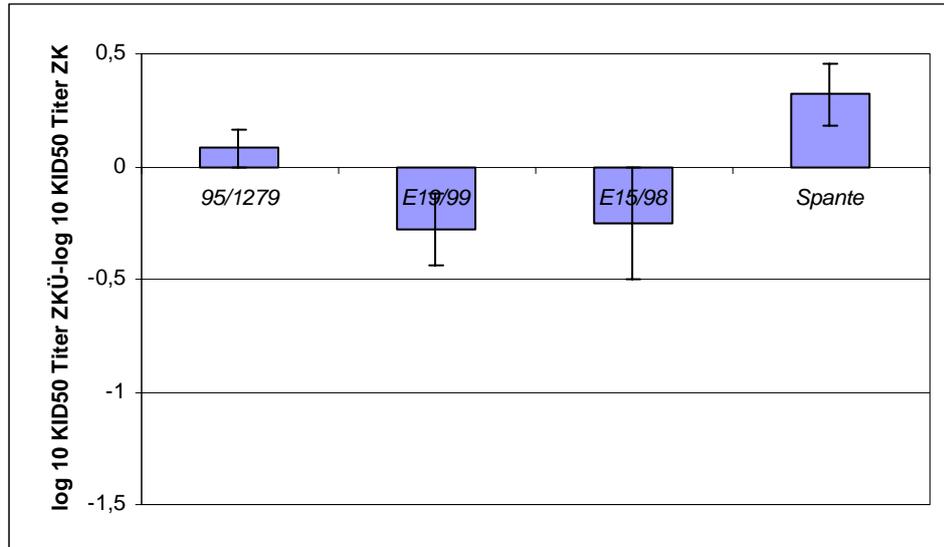
**Abb. 22:** Verhältnis zwischen Virus im ZKÜ und Virus in der ZK bei KSPV-Laborstämmen



**Abb. 23:** Ein-Schritt-Wachstumskurven der KSPV-Feldisolat



ZB: zellgebundenes Virus  
 ZF: zellfreies Virus (Virus im ZKÜ)

**Abb. 24:** Verhältnis zwischen Virus im ZKÜ und Virus in der ZK bei KSPV-Feldisolaten

#### 4.2.1.1.3. Titerverhältnis zwischen zellgebundenem und zellfreiem Virus im Zeitverlauf

Die Verhältnisse zwischen Virustiter im ZKÜ und in der ZK im Verlauf der Wachstumskinetik sind für beide Genotypen in Abb. 25 dargestellt. Die zu den Genotypen gehörigen Virusstämme bildeten dabei ab dem Zeitpunkt der erstmaligen Freisetzung von neusynthetisiertem Virus (10 h *p.i.*) 2 Kurvenscharen, die sich in ihrem Verlauf unterschieden. Dies wird besonders deutlich an Hand der aus den Titerverhältnissen der einzelnen KSPV gebildeten Mittelwerte.

#### 4.2.1.1.4. Statistische Auswertung

Zur statistischen Überprüfung der Unterschiede zwischen den ermittelten Indices bzw. Titerverhältnissen wurde der Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Test herangezogen (Littell *et al.*, 1996; Westfall *et al.*, 1999).

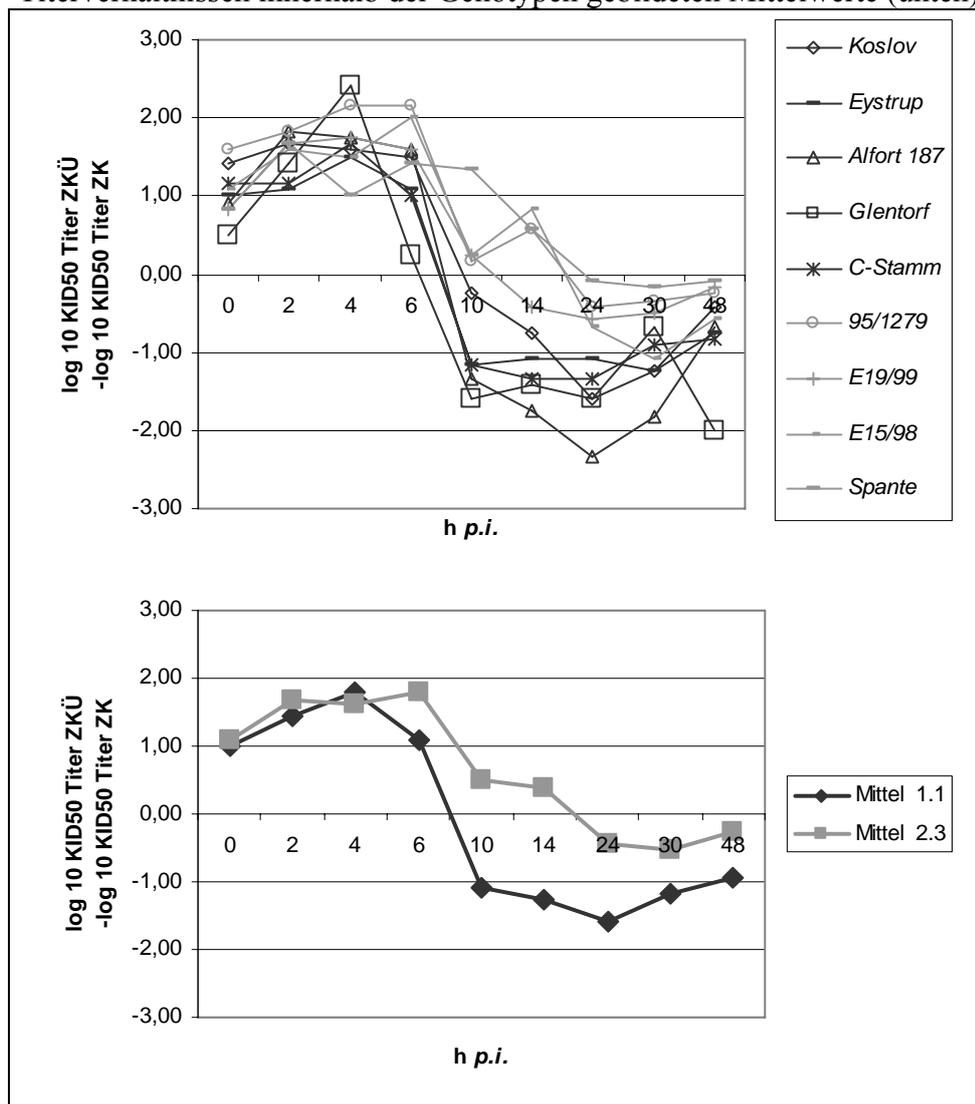
Der statistische Vergleich der aus den mittleren Virustitern im ZKÜ und in der ZK ermittelten Indices (vgl. 4.2.1.1.1. , 4.2.1.1.2. ) ergab folgendes Bild (Tab. 14): Die KSPV-Stämme vom Genotyp 1.1 bildeten 2 Gruppen C und D, innerhalb derer die Indices jeweils nicht signifikant voneinander abwichen. Der Gruppe C gehörten die Stämme *Koslov*, *Eystrup* und *C-Stamm*, der Gruppe D die Stämme *Eystrup*, *Alfort 187*, *Glentorf* und *C-Stamm* an. Gleiches galt für die KSPV-Isolate mit dem Genotyp 2.3, *95/1279* und *Spante* einerseits (Gruppe A) sowie *95/1279*, *E15/98* und *E19/99* andererseits (Gruppe B). Im Gegensatz dazu waren die Unterschiede zwischen den Indices aller dem Genotyp 1.1 angehörenden Stämme (Gruppen C und D) und denen der Isolate vom Genotyp 2.3 (Gruppen A und B) signifikant.

In gleicher Weise wurden die Titerverhältnisse zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten ausgewertet (Tab. 15). Die Unterschiede traten hierbei weniger eindeutig hervor als bei den

#### 4. Ergebnisse

Indices. Es kann jedoch festgestellt werden, dass zu den Probenahmezeitpunkten 10, 14 und 24 h *p.i.* die Titerverhältnisse der zu den unterschiedlichen Genotypgruppen gehörenden KSPV, von wenigen Ausnahmen abgesehen, jeweils zu sich signifikant unterscheidenden Gruppierungen zählten. Innerhalb derselben Genotypgruppe gab es hingegen keine signifikanten Abweichungen.

**Abb. 25:** Verhältnis zwischen Virus im ZKÜ und Virus in der ZK im Verlauf der Wachstumskinetik: Darstellung der einzelnen KSPV (oben) sowie der aus den Titerverhältnissen innerhalb der Genotypen gebildeten Mittelwerte (unten)



Mittel 1.1: Mittelwerte der Titerverhältnisse der KSPV vom Genotyp 1.1  
Mittel 2.3: Mittelwerte der Titerverhältnisse der KSPV vom Genotyp 2.3

#### 4. Ergebnisse

**Tab. 14:** Statistischer Vergleich der Indices aus den mittleren Titern in ZKÜ und ZK aller getesteten KSPV

KSPV-Stamm bzw. -Isolat	Index	Gruppierung im Test*
<i>Spante</i>	0,32	A
<i>95/1279</i>	0,08	A B
<i>E15/98</i>	-0,25	B
<i>E19/99</i>	-0,28	B
<i>Koslov</i>	-0,85	C
<i>Eystrup</i>	-1,07	C D
<i>C-Stamm</i>	-1,12	C D
<i>Gentorf</i>	-1,45	D
<i>Alfort 187</i>	-1,58	D

\* Die Indices der mit dem gleichen Buchstaben bezeichneten Viren unterscheiden sich nicht signifikant.

**Tab. 15:** Statistischer Vergleich der Titerverhältnisse zwischen ZKÜ und ZK zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten

KSPV-Stamm bzw. -Isolat	10 h <i>p.i.</i>		14 h <i>p.i.</i>		24 h <i>p.i.</i>		30 h <i>p.i.</i>		48 h <i>p.i.</i>	
	Titerverhältnis	Gruppierung im Test*								
<i>E15/98</i>	0,25	AB	0,83	A	-0,67	AB	-1,08	AB	-0,58	A
<i>95/1279</i>	0,25	AB	0,58	A	0,00	A	-0,42	A	0,00	A
<i>Spante</i>	1,33	A	0,58	A	-0,08	AB	-0,17	A	-0,08	A
<i>E19/99</i>	0,25	AB	-0,42	AB	-0,53	AB	-0,50	AB	-0,17	A
<i>Koslov</i>	-0,25	BC	-0,75	BC	-1,58	BC	-1,25	AB	-0,42	A
<i>Eystrup</i>	-1,17	CD	-1,08	BC	-1,08	ABC	-1,25	AB	-0,75	AB
<i>C-Stamm</i>	-1,17	CD	-1,33	BC	-1,33	ABC	-0,92	AB	-0,83	AB
<i>Glentorf</i>	-1,58	D	-1,42	BC	-1,58	BC	-0,67	AB	-2,00	B
<i>Alfort 187</i>	-1,33	CD	-1,75	C	-2,33	C	-1,83	B	-0,67	AB

\* Die Titerverhältnisse der mit dem gleichen Buchstaben bezeichneten Viren unterscheiden sich nicht signifikant.

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

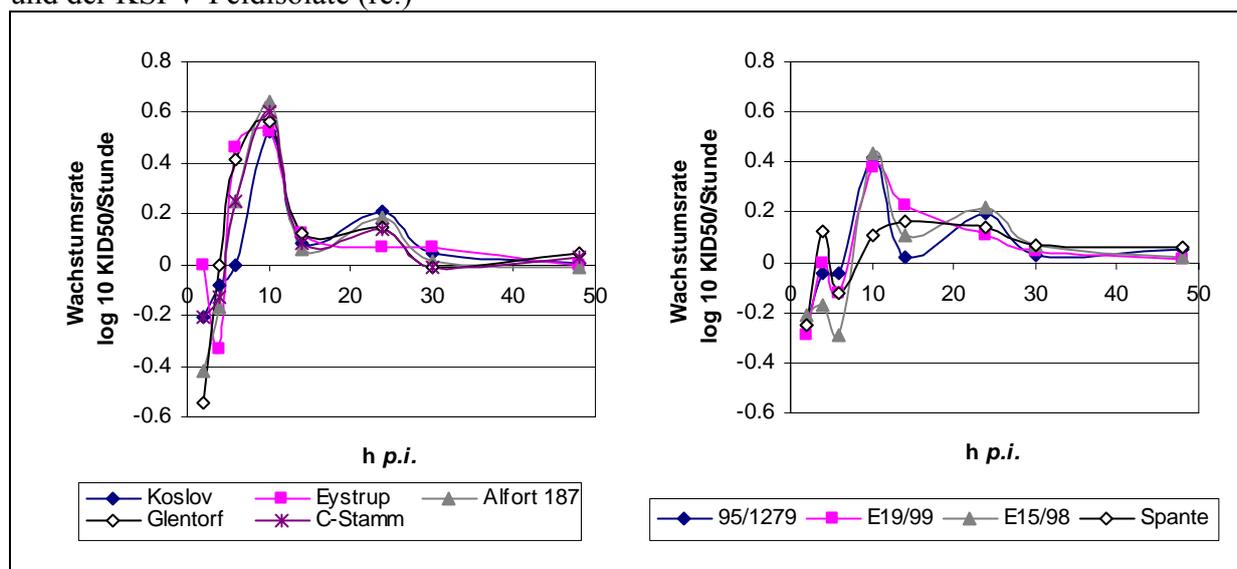
Nach der in 3.12.1.5.3. beschriebenen Formel wurde die Erste Ableitung und damit die Wachstumsrate des Virustiters pro Stunde zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten

berechnet. Aus den errechneten Werten wurden Kurven erstellt, aus denen die Wachstumsrate des Virus zu jedem Zeitpunkt der Kinetik ablesbar war.

#### 4.2.1.2.1. Zellgebundenes Virus

In den ersten Stunden *p.i.* lagen die Wachstumsraten bei allen untersuchten Viren im negativen Bereich (Abb. 26). 4 bis 6 h *p.i.* stieg bei den Laborstämmen (Genotyp 1.1) die erste Ableitung der Wachstumskurve in den positiven Bereich, bei den jüngeren Feldisolaten erst nach 6 bis 10 h *p.i.* Die höchste Wachstumsrate wurde bei allen Viren, außer beim Isolat *Spante*, 10 h *p.i.* erreicht. Dabei unterschieden sich wiederum Laborstämmen und Feldisolaten. Erstere erreichten Wachstumsraten von 0,5 bis 0,6 KID<sub>50</sub>/h, letztere nur um 0,4 KID<sub>50</sub>/h. Das Isolat *Spante* hatte die Phase der höchsten Wachstumsintensität erst 14 h *p.i.* mit rund 0,2 KID<sub>50</sub>/h. Nach einer vorübergehenden Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit trat ein zweiter, kleinerer Wachstumsspeak mit nur geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Viren um 24 h *p.i.* auf, bevor die Virusvermehrung ein Plateau erreichte. Insgesamt fiel vor allem die Kurve von *Spante* ins Auge, die im Gegensatz zu allen anderen Viren keinen wirklichen Höhepunkt aufwies. *Eystrup* und *Glentorf* zeigten bereits 6 h *p.i.* hohe Vermehrungsraten, dafür fehlte der zweite kleinere Wachstumsspeak 24 h *p.i.* ebenso wie beim Feldisolat *E19/99*.

**Abb. 26:** Erste Ableitung der Wachstumskurven der KSPV-Laborstämmen (li.) und der KSPV-Feldisolate (re.)



#### 4.2.1.2.2. Zellfreies Virus

Die Wachstumsraten des Virus im ZKÜ schwankten während der ersten 10 bis 14 h *p.i.* bei den einzelnen Viren in unterschiedlich starker Weise um den Nullpunkt. Danach pegelten sie

sich bei allen Stämmen und Isolaten auf einen positiven Wert von bis zu 0,1 KID<sub>50</sub>/h ein. Deutliche Unterschiede zwischen den Viren traten dabei nicht auf (nicht dargestellt).

### 4.2.2. Expressionskinetik des Glykoproteins E2

#### 4.2.2.1. KSPV-Laborstämme

Abb. 27 zeigt ein typisches SDS-PAGE-Gel (hier *Alfort 187*; oben li.). An der gleichmäßig starken Ausprägung der Proteinbanden ist zu erkennen, dass etwa gleiche Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden. Daneben ist der dazugehörige E2-Western Blot abgebildet. Das Glykoprotein E2 konnte mittels Röntgenfilm hier erstmals 14 h *p.i.* detektiert werden. Ein ähnliches Bild zeigten auch die anderen KSPV-Laborstämme, bei denen ebenfalls 14 h *p.i.* bzw. 24 h *p.i.* (*Koslov* und *Glentorf*) erstmals eine Bande das Vorhandensein von Glykoprotein E2 anzeigte (Abb. 27).

Die mit der *Night Owl* bei einem repräsentativen Western Blot bestimmte Anzahl der Lumineszenzsignale innerhalb von 30 min lag ebenfalls bei allen Stämmen 14 h *p.i.* bzw. 24 h *p.i.* (*Glentorf*) erstmals mehr als 1% über dem Wert der Negativkontrolle (Abb. 28). Insgesamt wurden Lumineszenzintensitäten erreicht, die bis zu 217% des Wertes der Positivkontrolle betragen (*C-Stamm*, 48 h *p.i.*). Quantitative Unterschiede, die mit der unterschiedlichen Virulenz der Virusstämme korrelierten, traten dabei nicht auf.

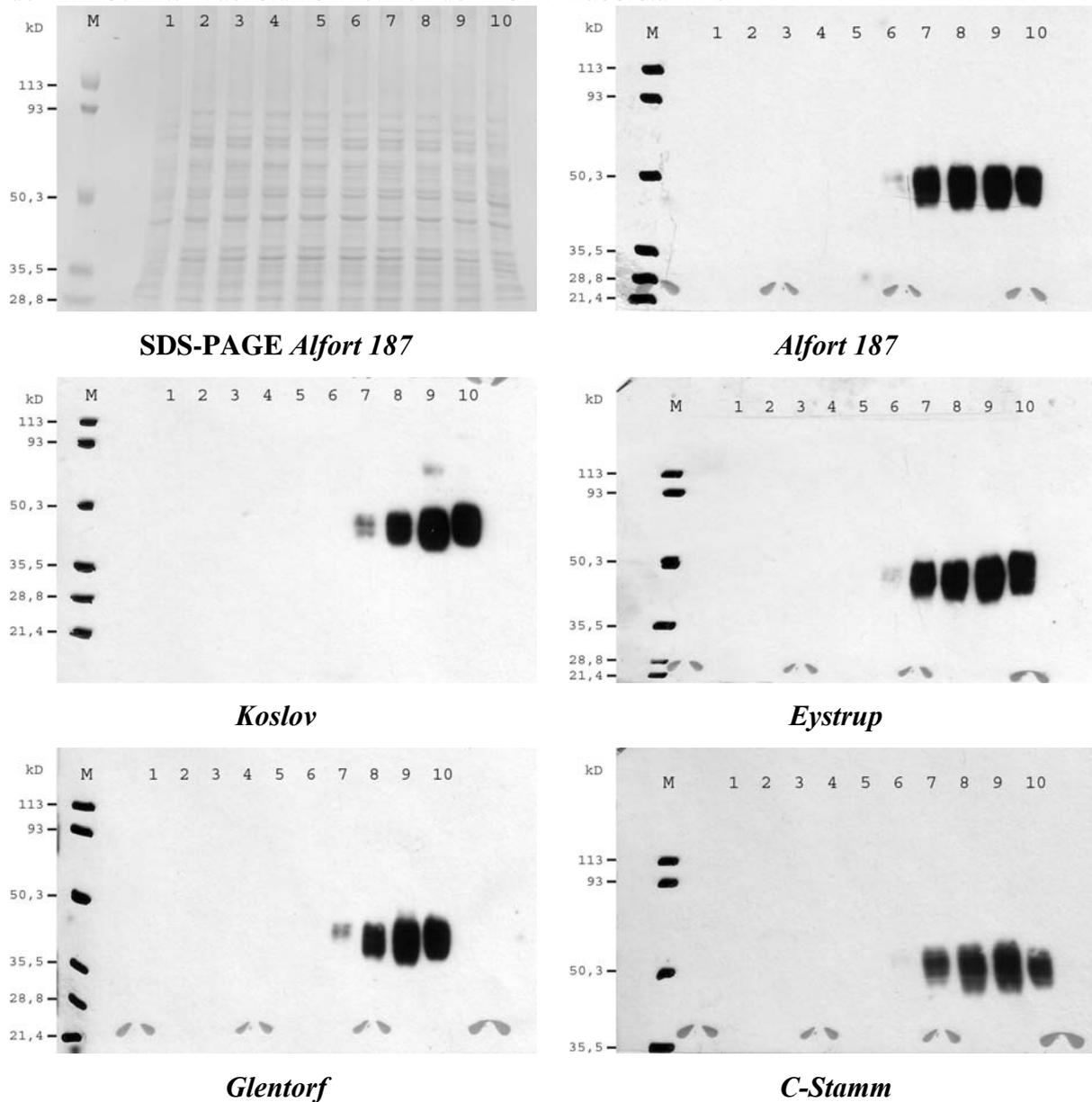
#### 4.2.2.2. KSPV-Feldisolate

Bei den Feldisolaten konnte E2 erst zu späteren Probenahmezeitpunkten (*E15/98*: 30 h *p.i.*, *Spante*: 48 h *p.i.*) bzw. mit geringerer Signalstärke detektiert werden als bei den Laborstämmen (Abb. 29).

Die in der *Night Owl* gemessenen Lumineszenzsignale bestätigten dieses Bild (Abb. 30). Intensitäten von mehr als 1% über dem Leerwert der Negativkontrolle wurden jeweils zu den Zeitpunkten erstmals bestimmt, zu denen zum ersten Mal eine Bande auf dem Röntgenfilm sichtbar war. Insgesamt lagen die Werte deutlich unter denen aller Laborstämme. Die höchste erreichte Lumineszenzintensität (*95/1279*, 48 h *p.i.*) betrug nur 62% der bei der mitgeführten Positivkontrolle gemessenen Intensität. Das Isolat *Spante*, das im Tierversuch nur eine schwache Virulenz zeigte (*Kaden et al.*, 2000c), wies hier die geringste E2-Menge auf. Lediglich 48 h *p.i.* konnte eine Lumineszenzintensität von 24% der Positivkontrolle ermittelt werden.

## 4. Ergebnisse

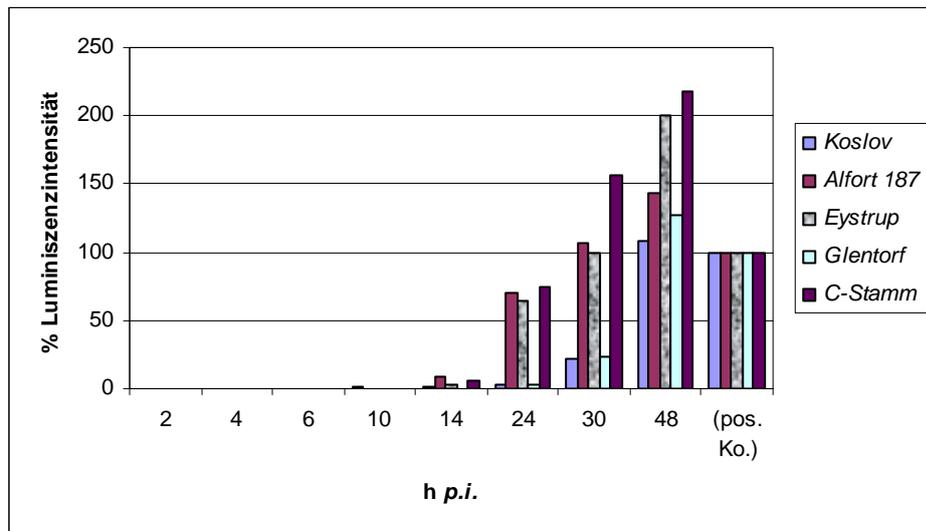
**Abb. 27:** SDS-PAGE (nur *Alfort 187*) und E2-Western Blots der Ein-Schritt-Wachstumskinetiken der KSPV-Laborstämme



M: Marker  
 1: Negativkontrolle  
 2: Zelllysate 2 h *p.i.*  
 3: Zelllysate 4 h *p.i.*  
 4: Zelllysate 6 h *p.i.*  
 5: Zelllysate 10 h *p.i.*  
 6: Zelllysate 14 h *p.i.*  
 7: Zelllysate 24 h *p.i.*  
 8: Zelllysate 30 h *p.i.*  
 9: Zelllysate 48 h *p.i.*  
 10: Positivkontrolle

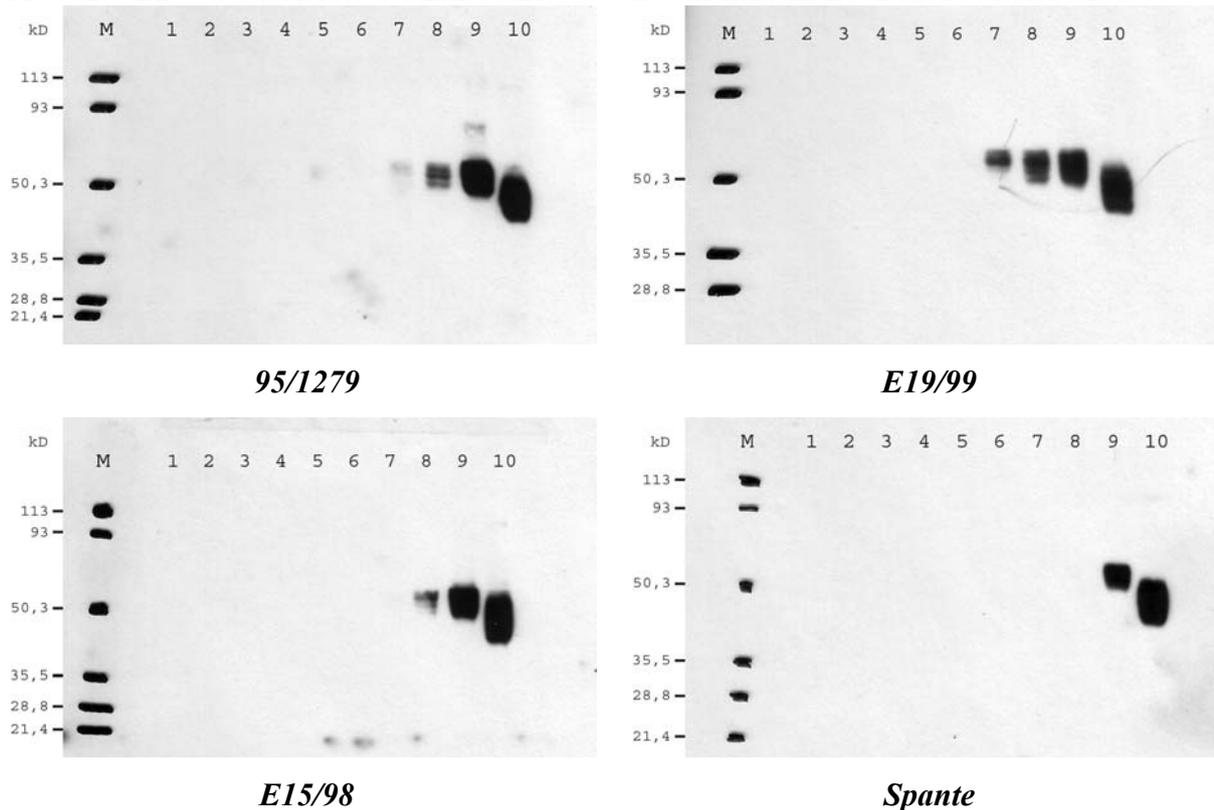
#### 4. Ergebnisse

**Abb. 28:** Prozentuale Lumineszenzintensität der einzelnen Zelllysate im E2-Western Blot im Vergleich zur Positivkontrolle (KSPV-Laborstämme)



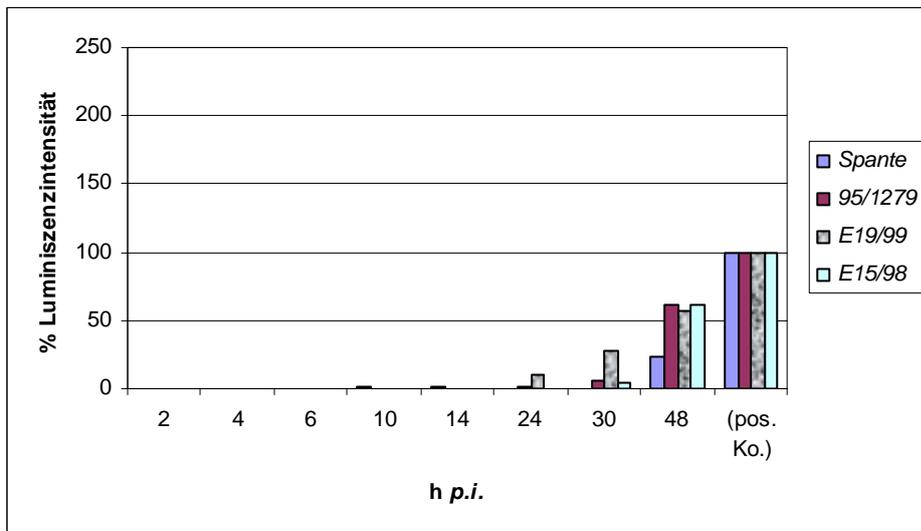
pos. Ko.: Positivkontrolle

**Abb. 29:** E2-Western Blots der Ein-Schritt-Wachstumskinetiken der KSPV-Feldisolat



- |    |                      |     |                      |
|----|----------------------|-----|----------------------|
| M: | Marker               |     |                      |
| 1: | Negativkontrolle     | 6:  | Zelllysate 14 h p.i. |
| 2: | Zelllysate 2 h p.i.  | 7:  | Zelllysate 24 h p.i. |
| 3: | Zelllysate 4 h p.i.  | 8:  | Zelllysate 30 h p.i. |
| 4: | Zelllysate 6 h p.i.  | 9:  | Zelllysate 48 h p.i. |
| 5: | Zelllysate 10 h p.i. | 10: | Positivkontrolle     |

**Abb. 30:** Prozentuale Lumineszenzintensität der einzelnen Zelllysate im E2-Western Blot im Vergleich zur Positivkontrolle (KSPV-Feldisolate)

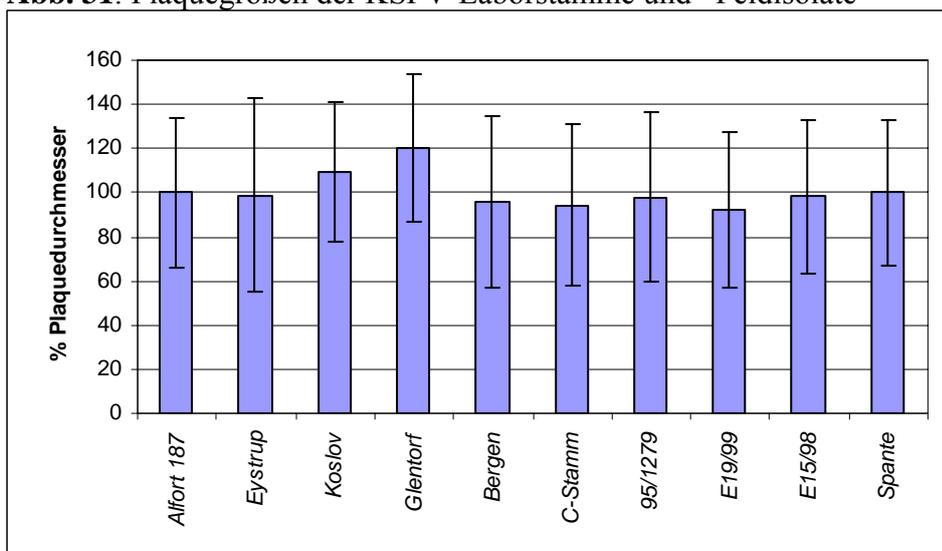


pos. Ko.: Positivkontrolle

#### 4.2.3. Bestimmung von Plauegrößen

Der Vergleich der mittleren Plaue Durchmesser der Laborstämme und Feldisolate fand in den hier beschriebenen Experimenten nach einer Inkubationszeit von 72 h statt. Als Referenz diente dabei *Alfort 187*, dessen durchschnittliche Plauegröße auf 100% festgelegt wurde. Die Plauegrößen der übrigen KSPV sind in Abb. 31 im prozentualen Verhältnis dazu angegeben. Deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Viren traten nicht auf.

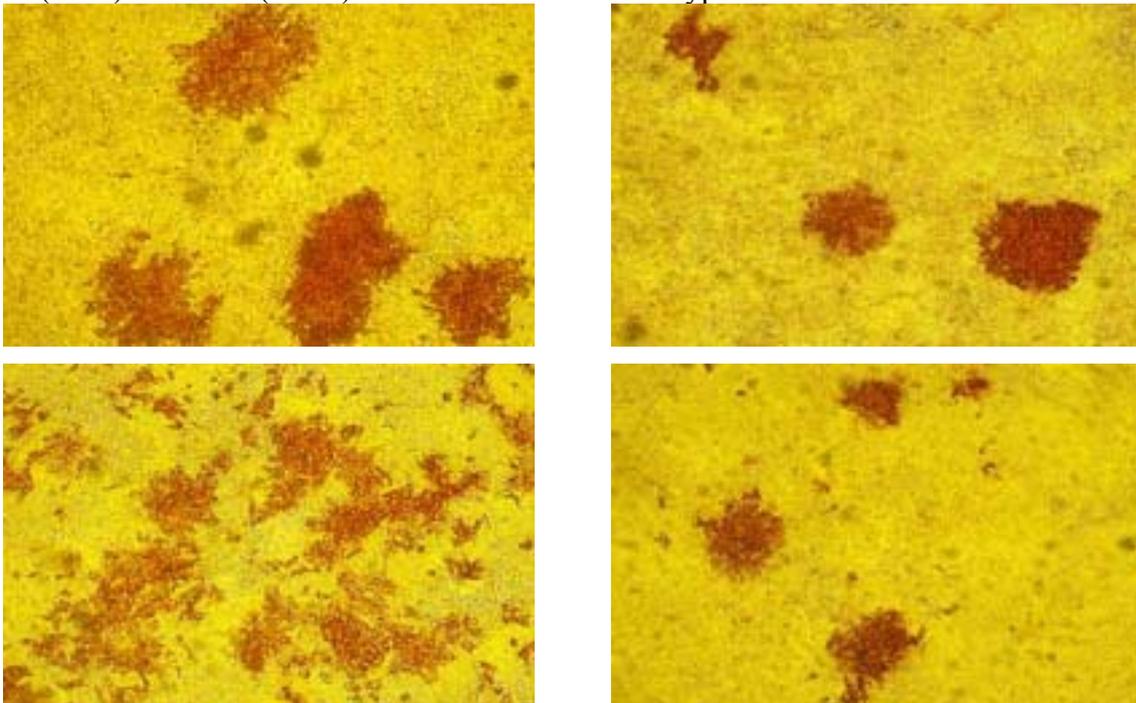
**Abb. 31:** Plauegrößen der KSPV-Laborstämme und –Feldisolate



Um die sekundäre Infektion von Zellen über in das Medium sezerniertes Virus zu verhindern, wurde dem EM ein anti-KSPV-Hyperimmunserum zugesetzt. Zur Demonstration der

unterschiedlichen Verbreitung des KSPV in der Zellkultur mit und ohne Hyperimmunserumzusatz fand in einem Teilexperiment die vergleichende Infektion von PK-15-Zellen mit einem hochvirulenten KSPV (*Eystrup*) und einem schwachvirulenten KSPV (*Spante*) jeweils mit und ohne Zusatz des Hyperimmunserums statt. Während der hochvirulente Stamm *Eystrup* ohne Zusatz des Serums eine große Zahl von infizierten Einzelzellen und kleineren Sekundärplaques und unter Serumzusatz ausschließlich große Einzelplaques zeigte, unterschied sich bei dem schwachvirulenten Isolat *Spante* die Verteilung der infizierten Zellen mit und ohne Serumzusatz mit Ausnahme weniger infizierter Einzelzellen bei letzterem nur wenig (Abb. 32). Ein ähnlicher Effekt wie für *Eystrup* gezeigt, war in einem anderen Experiment auch beim Stamm *Alfort 187* zu beobachten (nicht dargestellt).

**Abb. 32:** Mit den KSPV *Eystrup* (li.) und *Spante* (re.) infizierte PK-15-Zellen mit (oben) und ohne (unten) Zusatz von anti-KSPV-Hyperimmunserum



*Eystrup*

*Spante*