

## UNTERSUCHUNG ZUR WIRKSAMKEIT DER IMPFUNG MIT EINEM BVDV1 ·LEBENDIMPFSLOFF SOWIE MIT EINEM INAKTIVIERTEN BVDV1 ·LMPF SLOFF GEGEN EINE BVDV2·TESLINFEKTION

Von J.C. Thibault, C. Hamers, B. Couvreur, C. Letellier, P. Dehan, A. Brun, L. Fisher, P.P. Pastoret  
und P. Kerkhofs

**KEYWORDS:** BVDV1 –BVDV2 - Vakzination

### ABSTRACT

The aim of the study was to determine the crossprotection against a challenge infection with a highly virulent BVDV2-strain (strain 890) after a single vaccination with a BVDV1 live vaccine (Vacoviron®/Mucosijfa®) or a repeated vaccination with a BVDV1 inactivated vaccine (Mucobovin®). Fifteen calves were allotted into one control- and two vaccine groups. The Mucobovin®-group was vaccinated at days 61 and 29, and the Vacoviron®-group at day 61 before challenge infection. The calves were monitored by clinical observation using the point-scheme of Cortese (behaviour, haemorrhages, respiratory symptoms and diarrhoea), and by haematological (leukocyte and platelet count), virological (virus isolation in cell culture and RT-PCR) and serological parameters. The animals vaccinated with the live vaccine displayed the best immunity of the three groups. The Mucobovin® group also developed immunity, but clinical signs were more pronounced than in the Vacoviron® group. The control group exhibited significant clinical changes in contrast to the vaccine groups. Four of the five control animals and one calf in the Mucobovin®-group were leukopenic. After the challenge infection, virus was only isolated from the control animals. RT-PCR was positive on 20 samples (over a 12 days period) in the control-group, and in six samples (over a five days period) in the Mucobovin® group and remained negative in the Vacoviron® vaccinated animals. The control animals sero-converted after the challenge infection, the Mucobovin® group after the second vaccination and the Vacoviron® animals after the single vaccination. Antibody-titers in all groups increased markedly after the challenge infection. The study shows that the vaccination with a BVDV1 vaccine can produce an adequate protection against a BVDV2 infection.

## Einleitung

Eine wichtige Eigenschaft des BVD-Virus ist die große Variabilität zwischen den verschiedenen Stämmen. Dabei kann auch die Virulenz sehr unterschiedlich sein: während die meisten BVDV-Stämme wenig oder mäßig virulent sind, wurden in den späten achtziger Jahren in Nordamerika hochvirulente Stämme bekannt, die zu einem Hamorrhagischen Syndrom und hoher Letalität führten (Abb. 1). Die Sequenzierung dieser hochvirulenten Isolate zeigte

deutliche genetische Unterschiede im Vergleich zu klassischen BVD- Virusisolaten. Dies führte zu einer Unterteilung des BYD-Virus in zwei Genotypen : Genotyp 1, das klassische wenig bis mäßig virulente Isolate (z.B. NADL. Osloss) umfasst, und Genotyp 2, welcher sowohl hochvirulente Isolate, aber auch gering virulente Stämme beinhaltet. BVDV2-Stämme wurden schon in vielen Ländern weltweit isoliert und bilden einen beachtlichen Anteil an den bedeutenden antigenetischen Unterschieden zwischen BVD-Virusstämmen, vor allem zwischen BVDV1 und BVDV2 werfen die Frage bezüglich einer Kreuzimmunität durch Impfstoffe eines Typs gegenüber einer Infektion mit dem anderen BVD-Virustyp auf. BVDV Isolate (ca. 10 bzw. 50 % in Europa bzw. in den USA). Die Studien zur Kreuzneutralisation geben schon Hinweise auf den Grad eines Schutzes, für eine genauere Aussage sind jedoch Studien mit Testinfektionen nötig. Mehrere Studien wurden in den letzten Jahren durchgeführt und zeigten eine Kreuzimmunität von Typ-1-Lebendimpfstoffen gegenüber Typ 2. Mit inaktivierten Vakzinen sind diesbezüglich jedoch noch wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Das Ziel der Studie war daher zu untersuchen, welchen Schutz eine inaktivierte BVDV-Vakzine (mit zwei Impfstämmen) gegen einen hochvirulenten BVDV2-Testvirusstamm vermittelt. Die Studie beinhaltete zusätzlich die Untersuchung des Schutzes durch eine in Europa weit verbreitete BVDV1-Lebendvakzine.

## Studiendesign

### KILBER

Der ganze Versuch wurde in einer isolierten Anlage durchgeführt. Fünfzehn BYD-Virus- und Antikörper-freie männliche Danische Kreuzungskalber wurden nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen à 5 Kalber aufgeteilt. Die Gruppen wurden nach dem Impfstoff, den sie erhielten, bzw. als Kontrollgruppe benannt. Während des Zeitraums der Immunisierung (bis zum Tag der Testinfektion Tag C), wurden drei zusätzliche Kalber mit den Gruppen zusammen gehalten, um eventuelle Feldinfektionen mit BYD-Viren aufdecken zu können.

### IMPFUNGEN

Impfstoffe (Abb. 2): VACOVIRON ist ein Lebendimpfstoff und beinhaltet einen Oregon C24V-Stamm aus der BVDV1a Gruppe. Dagegen ist MUCO-BOVIN ein inaktivierter Impfstoff und besteht aus einer Kombination eines BYD-Virus der Gruppe 1b (Stamm »New York«) und eines Border Disease-Virus (Stamm »Aveyronite«).



Abb. 1 : Entstehung hämorrhagischer Läsionen in Zusammenhang mit einer hyper-virulenten BVD Virus Infektion (Navetat, in *Ann. Med. Vet.*(1996) , 140, 435-438) .

Imp/schema : Die Kalber der MUCO- BOVIN- und der Kontrollgruppe erhielten 2 Injektionen, 61 und 29 Tage vor der Testinfektion. Die Kalber der VACOVIRON-Gruppe wurden einmal geimpft, 61 Tage vor der Testinfektion.

## TESTINFEKTION

Am Tag der Testinfektion wurden alle 15 Versuchskalber intranasal mit 10 ml (5 ml je Nasenloch) einer BVD-Virus-suspension vom BVDV2-Stamm 890 mit einer Gesamtdosis von  $3,56 \times 10^5$  GKIDso pro Tier infiziert.

## KLINISCHE UNTERSUCHUNG

Alle Kalber wurden vor der Testinfektion klinisch untersucht. Nach der Testinfektion wurden die Tiere 23 Tage lang täglich, bzw. alle 2 Tage untersucht. Die klinische Untersuchung wurde gemäß dem Punkteschema nach Cortese durchgeführt und ausgewertet. Dabei wurde Folgendes untersucht: Verhalten, Blutungsneigung, Atemwegssymptomatik (insbesondere Dyspnoe, Rosten oder Nasenausfluss) und Durchfall. Die Punkte für diese vier Kriterien wurden wie folgt vergeben: kein Befund = 0, geringgradiger Befund = 1, mittelgradiger Befund = 2, hochgradiger Befund = 3. Die Gesamtpunktzahl für jedes Kalb wurde durch Addition der Einzelpunkte ermittelt.

## PROBENENTNAHME

Während der Phase der Immunisierung bis zum Tag der Testinfektion wurden alle 2 Wochen Blutproben entnommen. Nach der Testinfektion wurden bis zum Tag 23 dreimal in der Woche Blutproben und Nasentupfer entnommen.



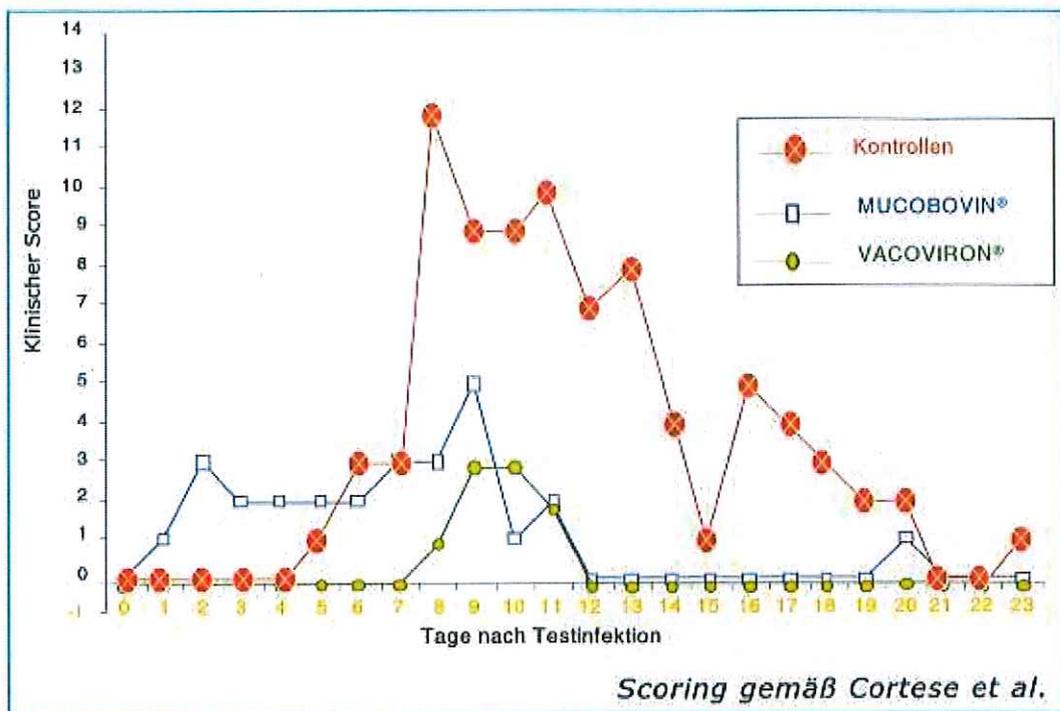


Abb. 3: Klinische Bewertung der Tiere nach der Testinfektion

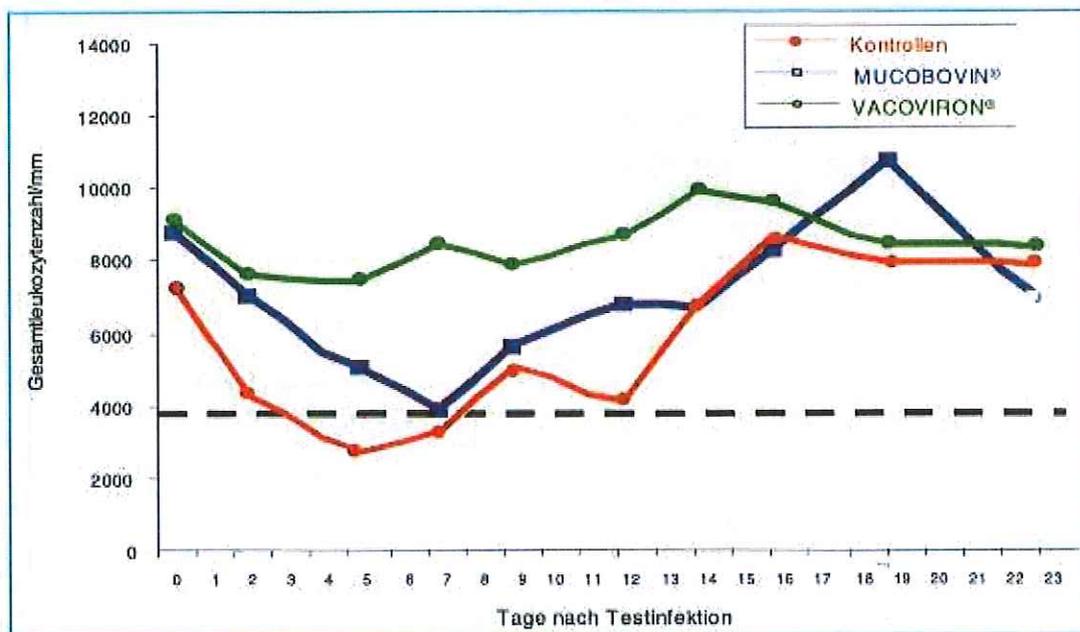


Abb. 4: Hamatologische Ergebnisse : Gesamtleukozytenzahl

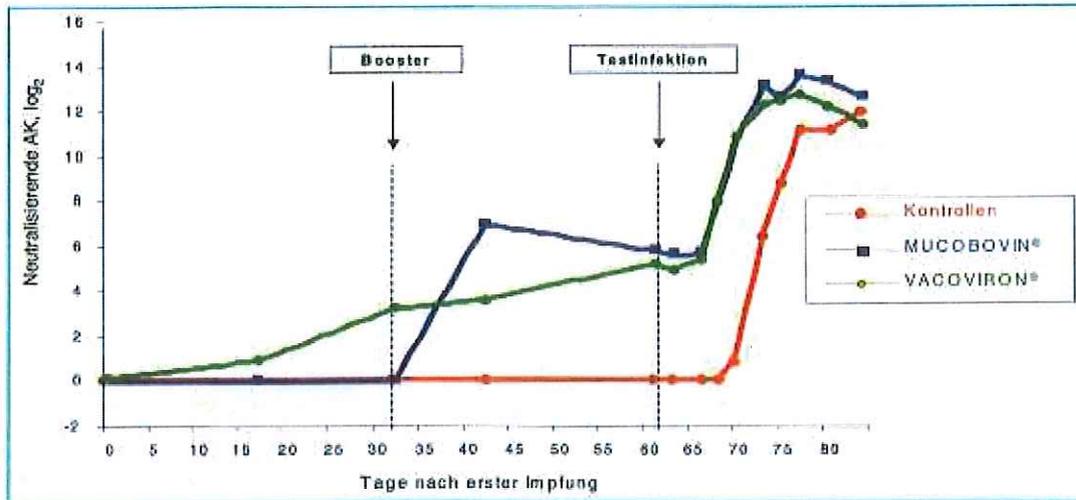


Abb . 5: Neutralisierende Antikörper gegen BVDV2 (CD87) nach Impfung mit dem Lebendimpfstoff (VACOVIRON) oder dem inaktiviertem Impfstoff (MUCOBOVIN) Untersuchung der Blutproben

Die Untersuchung der Blutproben fand innerhalb von 4 h nach der Probennahme statt.  
 Hamatologie: Die Leukozytenzählung wurde in der Leukozytenfraktion sowohl durch Virusanzüchtung in der Zellkultur, gefolgt von Immunfluoreszenz als auch durch RT-PCR durchgeführt. Der Korpertiter wurde im Neutralisationsden Seren aller Kalber bestimmt. Der Stamm Osloss diente als Referenzstamm für BVDV Typ 1, der Stamm CD 87 für BVDV Typ 2.

## Ergebnisse

### KLINISCHE UNTERSUCHUNG

(Abb. 3)

Es wurden keine hämorrhagischen Läsionen oder hochgradige Atemwegsbefunde erhoben. In der Kontrollgruppe wurde im Mittel ein starker Anstieg der Korpertemperatur (mit einem Maximum über 40°C) ermittelt. Gleichzeitig war die Futteraufnahme reduziert, und es wurde eine allgemeine Schwäche bei den Kalbern beobachtet. In der Mucobovin-Gruppe wurde auch ein Anstieg der Korpertemperatur verzeichnet, der jedoch geringer und von kürzerer Dauer als in der Kontrollgruppe war. In der Vacoviron-Gruppe gab es keinen Anstieg der Korpertemperatur über 39,5°C. Alle Tiere der Kontrollgruppe hatten einen leichten Husten und/oder Nasenausfluss. Drei Tiere aus dieser Gruppe litten unter leichtem bis schwerem Durchfall. In der Mucobovin-Gruppe hatte nur ein Kalb leichten Durchfall, zwei Kalber hatten leichten Nasenausfluss. In der Vacoviron-Gruppe hatten zwei Tiere einen nur leichten, vorübergehenden Nasenausfluss (3 Tage). Die Punkte-Bewertung der klinischen Befunde der geimpften Gruppen lag von Tag 8 bis 13 und am Tag 16 signifikant niedriger ( $p=0,038$ ) als die der Kontrollgruppe.

## BLUTPARAMETER

(Abb. 4)

Die mittleren Leukozytenzahlen je Gruppe: Vier der fünf Kontrolltiere zeigten eine ausgeprägte Leukopenie (unter 4 000 Leukozyten/ $\mu$ l). In der Mucobovin-Gruppe hatte nur ein Kalb eine Leukopenie. In der Vacoviron-Gruppe trat bei keinem Tier eine Leukopenie auf. In einer späten Phase nach der Testinfektion zeigten einige (2 bis 3) Kalber aus jeder Gruppe eine reaktive

**Tabella 1: Ergebnisse: Virologie Untersuchungen auf Virämie mittels RT-PCR**

Tage nach Testinfektion	Kontrollen	Mucobovin	Vacoviron
0	—	—	—
2	—	—	—
5	5	1	—
7	5	3	—
9	5	1	—
12	3	—	—
14	1	—	—
16	1	—	—
19	—	—	—
23	—	—	—
	20	5	0

Leukozytose (fiber 10 000 Leukozyten). Aufgrund hoher individueller Streuung waren die Unterschiede zwischen den Gruppen jedoch nicht signifikant.

## SEROLOGIE

Die drei Sentinel-Kalber blieben Antikörper-negativ sowohl für BVDV Typ 1 als auch 2, was zeigt, dass keine externe Kontamination mit Pestiviren stattgefunden hatte. Die Darstellung in Abbildung 5 zeigt den Antikörpertiter gegen den Typ2-Stamm CD87. Wie zu erwarten war, fand in der Kontrollgruppe vor der Testinfektion keine Serokonversion statt. Am Tag 9 nach der Testinfektion kam es zur Serokonversion mit einem durchschnittlichen maximalen Titer von 12.0 (in log<sub>2</sub>). Die Mucobovin-Gruppe zeigte nach der ersten Impfung keine Serokonversion. Nach der zweiten Impfung kam es zu einem starken Anstieg des Antikörpertiters gegen Typ2 und zu einem weiteren starken Anstieg kurz nach der Testinfektion. In der Vacoviron-Gruppe waren neutralisierende Antikörper gegen Typ 2 in der Blutprobe 32 Tage nach der Impfung nachweisbar. Sie stiegen bis zur Testinfektion stetig bis zu einem mittleren Wert von 5.0 log Stufen an, kurz nach der Testinfektion kam es ebenfalls zu einem starken Anstieg. Die mittleren Antikörpertiter der beiden Impfgruppen erreichten am Tag 23 nach der Testinfektion Werte zwischen 12 und 13. Die mittleren neutralisierenden Antikörpertiter gegen CD87 lagen mit Ausnahme des Versuchsendes (23 Tage nach Testinfektion) in den beiden Impfgruppen immer deutlich signifikant höher ( $p < 0,0001$ ) als in der Kontrollgruppe.

## VIROLOGISCHE PARAMETER

Nachweis einer Virämie Der Nachweis des infektiösen BVDVirus durch Virusanzüchtung gelang nur aus der Leukozytenfraktion von Tieren aus der Kontrollgruppe. Diese Daten sind hier nicht extra gezeigt. Aus Tabelle 1 sind die Nachweise mittels RT-PCR zu entnehmen. Bei allen Kontrolltieren war ein positiver Nachweis fiber mindestens 5 Tage und bis zu 12 Tagen zu finden. Bei zwei der Mucobovin-geimpften Tieren fand. in der RT-PCR an einem Tag ein Antigennachweis statt, bei einem Tier an drei Tagen, wohingegen bei den Vaccovironeimpften Tieren auch in der RT-PCR an keinem Tag BVDV-Antigen nachgewiesen wurde. Der Virus- bzw. Antigennachweis im Blut war bei den Impfgruppen gegenüber den Kontrollgruppen hoch signifikant reduziert ( $p=0,0008$ ).

## Discussion

Ziel dieser Studie war, den klinischen und virologischen Schutz von zwei kommerziellen BVD-Impfstoffen gegenüber einer Testinfektion mit einem hochvirulenten BVD-Typ 2-Virus zu untersuchen. Obwohl die klinischen Symptome bei den Tieren der Kontrollgruppe nicht so stark wie erwartet waren (keine hamorrhagische Diathese oder schwere respiratorische Symptomatik, sicher aufgrund des Alters der Tiere), waren diese trotzdem signifikant stärker als in den Impfgruppen. Vor allem das Fieber war bei den Tieren der Kontrollgruppe viel höher als in den beiden Impfgruppen. Diese Studie zeigt, dass die Tiere, die mit dem Lebendimpfstoff Vaccoviron geimpft wurden, vollständig gegenüber der Testinfektion mit dem BVD-Typ-2-Virus geschützt waren und die mit dem inaktivierten Impfstoff alleine geimpften Tiere einen zwar geringeren, jedoch fiberzeugenden Schutz aufwiesen. Die beiden Impfstoffe Mucobovin und Vaccoviron können somit erfolgreich in der Praxis eingesetzt werden, um vor BVDV-2 Infektionen zu schützen. Wichtig ist es darauf hinzuweisen, dass unter Kombination der beiden untersuchten Impfstoffe Mucobovin und Vaccoviron in Deutschland das Zweistufige Impfverfahren gepriift und zugelassen ist. Dabei wird bei der Grundimmunisierung zuerst der inaktivierte Impfstoff mit den zwei Impfstämmen, MUCOBOVIN, verabreicht und nach 4 bis 6 Wochen der Lebendimpfstoff mit systemischer Vermehrung, VACOVIRON. Wiederholungsimpfungen erfolgen mit MUCOBOVIN, unabhängig vom Trachtigkeitsstadium und nur einmal jährlich. Durch dieses zweistufige Impfverfahren werden besonders hohe und lang anhaltende Antikorpertiter sowie ein polyvalenter, stammfibergreifender Impfschutz erzielt.

## DANK

gilt der Gruppe von Prof. Pastoret am Institut für Virologie der Universität in Liittich, jener von Dr. Kerkhofs bei CERVA in Brussel und dem technischen Personal der Machelen Isolierstation.