

4. Experimentelle Studien

4.1. Köderherstellung und Köderaufnahme

4.1.1. Köderentwicklung und Ködervarianten

Für die Herstellung der verschiedenen Impfstoffköder (Abb. 3a-3d) wurde die Rohmasse (Ködermatrix) verwendet, die auch die Grundlage für den Köder der „Schweinepestoralvakzine“ (RIEMSER Arzneimittel AG, Greifswald-Insel Riems) bildet. Sie besteht aus Kokosfett, Maismehl, Magermilchpulver, Polarit und Aromastoffen (Lange, persönliche Mitteilung). Um die Attraktivität der Köder für die Tiere zu verbessern, wurden der Ködermasse zusätzlich einige Tropfen Bittermandelaroma (Hersteller: Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld) hinzugesetzt. Zur Köderherstellung wurde die mit Aromastoff angereicherte Köderrohmasse bei 60°C im Wasserbad flüssig gehalten und langsam in die vorbereiteten Köderformen gegossen. Für die Aufnahmestudien erfolgte die Herstellung von flachen runden Ködern (Ø 4 x 0,8 cm), rechteckigen Köder (2,5 x 2,0 x 1,5 cm) sowie kugelförmigen Ködern mit den Durchmessern 1,8 cm und 3,0 cm.

Abb. 3a-3d für eigene Studien verwandte Köderformen

Abb. 3a



Abb. 3b



Abb. 3c

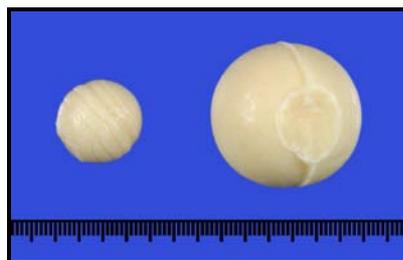
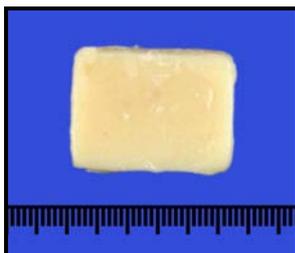


Abb. 3d



Die Ausgussformen (Abb. 4a-4d) bestanden aus jeweils zwei Hälften hitzebeständiger Hartplastik- (Köder mit 3,0 cm Durchmesser) bzw. Metallschalen (Köder mit 1,8 cm Durchmesser), die durch Flügelschrauben zusammen gehalten wurden.

Abb. 4a-4d Ausgussformen zur Herstellung runder Köder

Abb. 4a

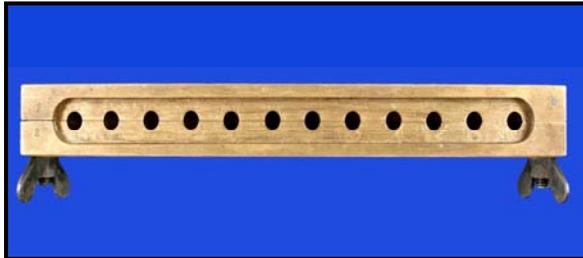


Abb. 4b

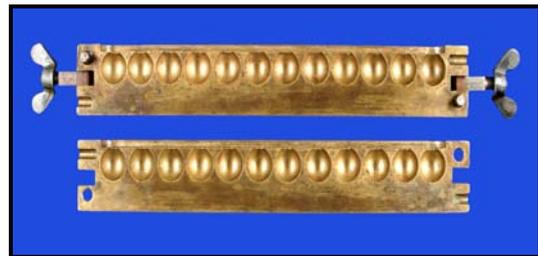


Abb. 4c

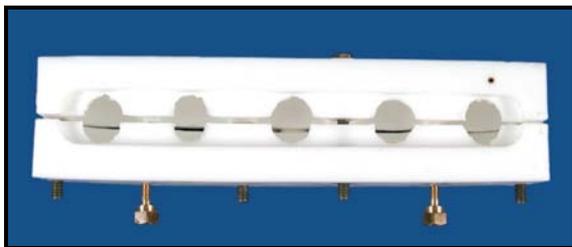
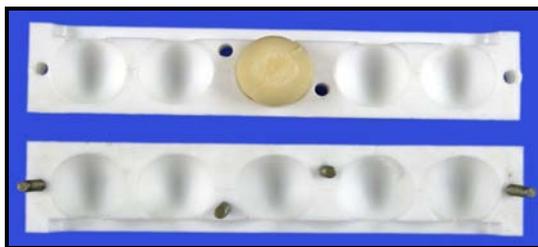


Abb. 4d



Die beschickten Formen wurden für eine halbe Stunde in den Kühlschrank gestellt, anschließend für eine weitere halbe Stunde in das Gefrierfach (-20°C), um das Aushärten der Ködermasse zu beschleunigen. Bis zu ihrer Verwendung lagerten die Köder (Abb. 3a-3d) bei 4°C.

4.1.2. Köderaufnahme

Für die Aufnahmestudien wurden fünf Absatzferkel im Alter von zwei Monaten aus einem konventionellen Schweinemastbetrieb in Laufställen auf Stroheinstreu gehalten. Die fünf Wildschweine aus eigener Zucht waren zu Versuchsbeginn ebenfalls zwei Monate alt. Sie wurden in analogen Stallabteilungen mit Auslauf gehalten. Die Tiere erhielten zweimal am Tag pelletiertes Mastfutter und Trinkwasser ad libitum.

Die Köderauslage erfolgte bei den Hausschweinen im Stall (Abb. 5a und 5b), während die Wildschweine sowohl im Stall als auch im Auslauf die verschiedenen Köder angeboten bekamen (Abb. 6a und 6b).

Abb. 5a-5b Köderauslage bei den Hausschweinen

Abb. 5a



Abb. 5b



Abb. 6a-6b Köderauslage bei den Wildschweinen

Abb. 6a



Abb. 6b



Die Aufnahmestudien an Hausschweinen waren notwendig, da ein großer Teil der Tierversuche auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit von Wildschweinen (Frischlingen) an Hausschweinen durchgeführt werden und die Aufnahme aus diesem Grund auch bei diesen Tieren gewährleistet sein musste. Die Untersuchungen zur Köderaufnahme begannen im Alter von zwei Monaten und erstreckten sich in unterschiedlichen Intervallen bis zum Alter von einem halben Jahr.

Die unterschiedlichen Köder wurden zudem im Laufstall zur gleichen Zeit verteilt, um das Verhalten der Wildschweine zur Aufnahme der verschiedenartigen Köder zu studieren.

Um das Aufnahmevermögen zu evaluieren, wurde das Verhalten, die Art und Sequenz der Aufnahme sowie die dafür benötigte Zeit dokumentiert.

4.1.2.1. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Aufnahmestudie sind in den Tabellen (Tab.) 1 und 2 dargestellt. Wie aus diesen hervorgeht, ist bei zwei und zweieinhalb Monate alten Wildschweinen sowie unter drei Monate alten Hausschweinen keine Köderaufnahme zu verzeichnen. Die Tiere beschnüffeln den Köder und fressen ihn nur an. Eine komplette Köderaufnahme konnte bei keinem Tier beobachtet werden. Die *Hausschweine* zeigten mit drei Monaten erstes „Interesse“ bzgl. Köderaufnahme, nahmen jedoch die herkömmlichen und runden sowie die kugeligen (3 cm Durchmesser) und quaderförmigen Köder nur inkomplett auf. Das heißt, nur ein Teil der Ködermasse wurde gefressen. Die kleinen kugelförmigen Köder (1,8 cm Durchmesser) wurden in diesem Alter vollständig, aber relativ spät, d.h. verzögert, aufgenommen. Mit vier Monaten wurden alle Ködervarianten zügig und vollständig gefressen. Auch in diesem Altersabschnitt wurden die 1,8 cm großen Köder bevorzugt aufgenommen. Sie wurden innerhalb ca. 1 min verzehrt. Die quaderförmigen Köder sowie die herkömmlichen Köder waren nicht so attraktiv und wurden erst mit zeitlicher Verzögerung gefressen. Mit zunehmendem Alter der Schweine (fünf und sechs Monate alt) bestätigte sich die Präferenz der Tiere für die kugelförmigen Köder, welche komplett und innerhalb kürzester Zeit aufgenommen wurden (< 1 min), wobei die Hausschweine die kleineren Köder mit 1,8 cm Durchmesser den größeren Ködern (3,0 cm im Durchmesser) vorzogen und zuerst fraßen (Tab. 1).

Tab. 1 Köderaufnahme durch Hausschweine

Alter	Alte Köderformen		Neue Köderformen			Anmerkungen
			Kugel		Quader	
	aktuell 4x4x1.5 cm	rund Ø 4x0.8 cm	Ø 1.8 cm	Ø 3.0 cm	2.5x2x1.5 cm	
2 Monate	-	-	-	-	-	Anfressen, Schnüffeln
3 Monate	+	+	++	+	+	
4 Monate	++		+++	++	++	
5 Monate	++		+++ ²	+++	++	² zuerst gefressen
6 Monate	++		+++ ²	+++	++	² zuerst gefressen

In der *Wildschweine*gruppe konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden, mit dem Unterschied, dass in den ersten zweieinhalb Lebensmonaten keine Köderaufnahme erfolgte. Die ersten Aufnahmeaktivitäten wurden bei dreieinhalb Monate alten Tieren beobachtet (Tab. 2). In dieser Altersgruppe war die Akzeptanz für die mit einem Durchmesser von 1,8 cm relativ kleinen „Kugeln“ am größten. Eine vollständige Aufnahme konnte innerhalb von 3-5 min beobachtet werden. Der herkömmliche Köder sowie die anderen, größeren Ködervarianten wurden weniger gut aufgenommen. Sie wurden zum Teil lediglich angefressen. Die Köderakzeptanz stieg mit viereinhalb Monaten an (komplette, aber etwas verzögerte Aufnahme) und erreichte mit sechs Monaten ihr Optimum. Alle geprüften Köder wurden zu dem Zeitpunkt vollständig und in weniger als 1 min aufgenommen. Auch hier war eine Präferenz für die kugelförmigen Köder ersichtlich. Im Gegensatz zu den Hausschweinen bevorzugten die älteren Wildschweine bei freier Wahl den Köder mit 3 cm Durchmesser. Der quaderförmige Köder wurde, wie der Köder für die Riemser Schweinepestoralvakzine, erst mit 6 Monaten zügig (< 1 min) gefressen (Tab. 2). Das bedeutet, die unverzügliche Aufnahme erfolgte etwa 1,5 Monate später als dies bei dem kleinen kugelförmigen Köder der Fall war.

Tab. 2 Köderaufnahme durch Wildschweine

Alter	Alte Köderformen		Neue Köderformen			Anmerkungen
			Kugel		Quader	
	aktuell 4x4x1.5 cm	rund Ø 4x0.8 cm	Ø 1.8 cm	Ø 3.0 cm	2.5x2x1.5 cm	
2 Monate	-	-	-	-	-	
2,5 Monate	-	-	-	-	-	Anfressen, Schnüffeln
3,5 Monate	+	+	++	+	+	
4,5 Monate	++		+++	++	++	
5 Monate	++		+++	+++ ²	++	² zuerst gefressen
6 Monate	+++		+++	+++ ²	+++	² zuerst gefressen

4.1.3. Vakzinekapsel

Das Ergebnis der Aufnahmestudien zeigte deutlich, dass der neu entwickelte runde Köder sich am besten für eine Immunisierung von jungen Wildschweinen eignen dürfte. Da der in herkömmlichen Ködern verwendete Blister für diese Köderform nicht als Vakzinekapsel verwendbar ist, schlossen sich Untersuchungen mit Hart- und Weichgelatine-kapseln an (Abb. 7). Um die erforderliche Virusmenge via Gelatine-kapsel in die kleineren Köder zu verpacken, war es notwendig, die Vakzine zu lyophilisieren. Auf Grund der einfacheren Handhabbarkeit fanden als Vakzinebehältnis im neuen Köder Hartgelatine-kapseln mit Snap-Verschluss Verwendung.

Abb. 7 Vakzine kapseln



4.2. Lyophilisation

Zur Lyophilisation von Mikroorganismen werden Schutzstoffe (Gefrierschutz- und Trockenschutzmittel) verwendet, die die Aufgabe haben, die zu konservierenden Erreger vor einer Denaturierung zu bewahren und beim Einfrieren die Eiskristallbildung (mechanische Schädigung) weitgehend zu unterbinden. Wenngleich verschiedene Wirkstoffgruppen, wie niedermolekulare Verbindungen (z.B. Glukose, Laktose, Saccharose), hochmolekulare Stoffgruppen (Dextran, Gelatine, Serumalbumin) oder native biologische flüssige Medien (Magermilch, Blutserum) als TSM in Frage kommen, wurden die besten Erfahrungen bei Viren mit Schutzmedien gemacht, die sowohl Kohlenhydrate als auch Eiweiß enthalten (Liebermann, 1973). Die Zusammensetzung der beiden in dieser Arbeit verwendeten Schutzmittel ist im Kapitel „Material und Methoden“ aufgeführt.

Für die Gefriertrocknung der in der Arbeit untersuchten Viren, wurden die mit TSM (1/3 TSM) bzw. Gefrierschutzmittel (10% GS 4) versetzten Virussuspensionen in Mengen von je 1 ml in 2 ml fassende, sterile Injektionsflaschen verbracht und mit Gummistopfen abgedeckt. Nach der Lyophilisation erfolgte der luftdichte Verschluss der Flaschen mit Bördelkappen. Bis zu ihrer Verwendung lagerten die Flaschen bei 4°C.

4.3. Untersuchungen zur Stabilität des Vakzinevirus vom Stamm „C“ und der Chimäre CP7_E2alf

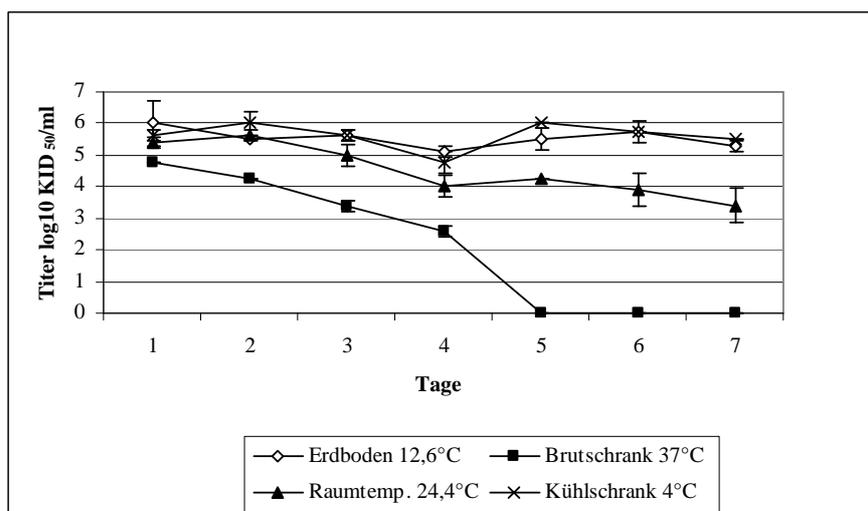
4.3.1. „C“-Vakzine: Vergleich der Stabilität von lyophilisierter und flüssiger Vakzine

Wie im Kapitel 2.5.3.2. beschrieben, sind die Impfstoffköder in praxi für fünf Tage Umwelteinflüssen ausgesetzt, je nach Jahreszeit Hitze, Kälte, Frost und/oder UV-Licht. Um festzustellen, ob das Impfvirus während dieser Zeit und unter verschiedenen Umweltbedingungen stabil bleibt, wurde, in Anlehnung an die Anforderungen für die o.I. der Füchse gegen Tollwut (Linhart, 1993; Linhart et al., 1996; Loepelmann, 1991), die Stabilität von flüssigem (ohne Oralschutzmittel) bzw. gefriergetrocknetem „C“-Virus über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht. Letzteres wurde, wie unter 4.2. erläutert, mit zwei verschiedenen Oralschutzmitteln (TSM/GS 4) versetzt. Zur Ermittlung der Stabilität des Virus wurden die Glasflaschen vier verschiedenen Temperaturprofilen ausgesetzt:

- a) Kühlschranktemperatur (4°C), b) vergraben im Erdreich (im Mittel bei 12,6°C),
- c) bei Raumtemperatur (Temperaturmittel 24,4°C) und d) im Brutschrank (37°C).

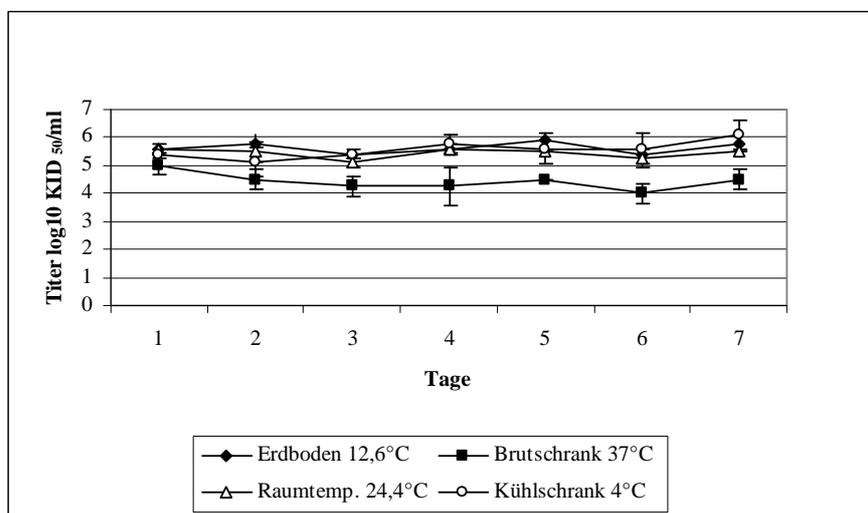
An jedem Untersuchungstag wurden zwei Flaschen pro verwendetem Konservierungsstoff (Lyo TSM/Lyo GS 4) bzw. Flüssigvirus und Temperaturbereich entnommen und, wie im Kapitel 3.2.3.1.3. beschrieben, auf geschlossener ZK titriert. In den Abb. 8 bis 11 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Abb. 8 Stabilität von „C“-Virus, flüssig ohne Oralschutzmittel



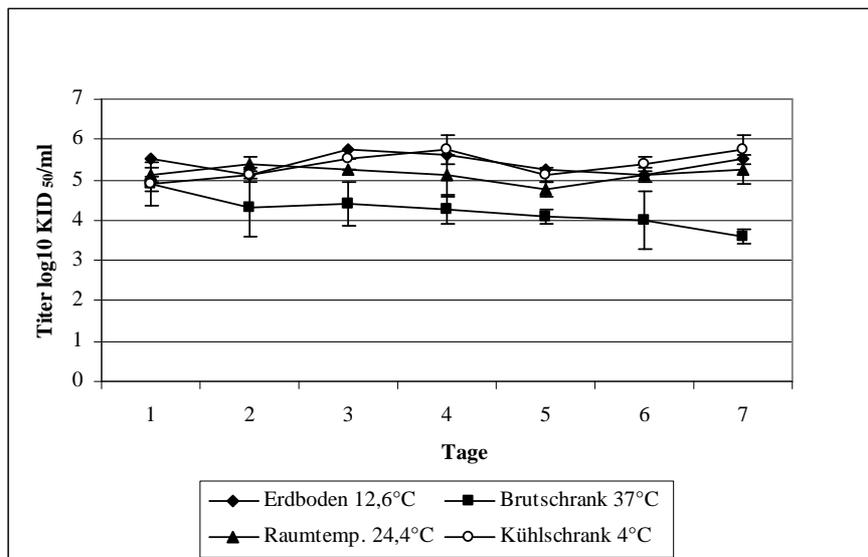
Die Ergebnisse zeigen, dass die Stabilität der Flüssigvakzine bei höheren Temperaturen (24,4°C und 37°C) nicht gewährleistet ist (Abb. 8). So sank der Virustiter bei 24,4°C bereits am 4. Tag von $10^{6,5}$ KID₅₀/ml (Ausgangstiter) auf $10^{4,0}$ KID₅₀/ml und erreichte am Ende der Untersuchungszeitraumes einen Wert von $10^{3,4}$ KID₅₀/ml. Lagerte das Virus im Brutschrank, war schon am 5. Tag kein Virusnachweis mehr möglich. Der Titer fiel innerhalb von vier Tagen von ehemals $10^{6,5}$ KID₅₀/ml (Ausgangstiter) auf $10^{2,6}$ KID₅₀/ml. Vergleicht man die Werte mit dem gefriergetrockneten Impfstoff, so fällt eine statistisch zu sichernde höhere Stabilität des lyophilisierten Virus auf (Mann-Whitney Rank Sum-Test, $p < 0,05$).

Abb. 9 Stabilität von „C“-Virus, lyophilisiert mit GS 4



Im Vergleich von Flüssigvakzine (Abb. 8) und GS 4 lyophilisiertem Virus (Abb. 9), waren über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 37°C und bei Raumtemperatur ($p < 0,05$) signifikant höhere Titer beim Lyophilisat zu verzeichnen.

Abb. 10 Stabilität von „C“-Virus, lyophilisiert mit TSM

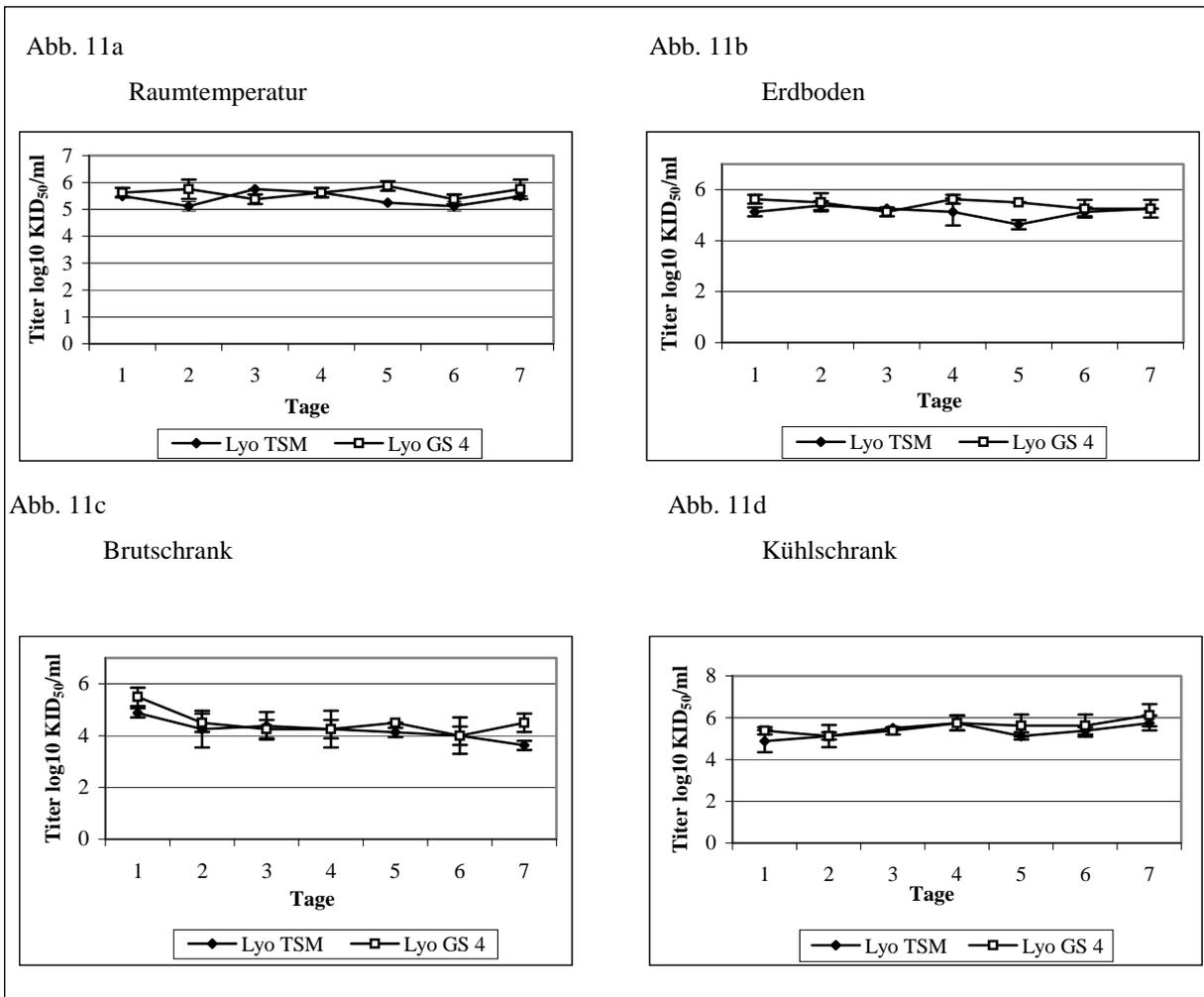


Bei Gegenüberstellung von flüssigem (Abb. 8) und mit TSM lyophilisiertem „C“-Stamm (Abb. 10) konnten innerhalb einer Woche ebenfalls signifikante Unterschiede bei 37°C, bei Raumtemperatur und bei 4°C ($p < 0,05$) festgestellt werden. Es ist also davon auszugehen, dass gefriergetrocknetes „C“-Virus über eine Zeitperiode von sieben Tagen eine höhere Stabilität aufweist als die homologe flüssige Vakzine. D.h., lyophilisierte Vakzine eignet sich daher besser für die o.I. von Wildschweinen, da der Impfstoff gegenüber höheren Temperaturen unempfindlicher ist.

Ein weiterer Vorteil von gefriergetrocknetem Impfstoff besteht darin, dass eine ausreichende Menge von PD_{50} in die kleineren, runden Köder verbracht werden kann, was bei Verwendung von Flüssigvakzine ein Problem darstellen würde.

Wie in weiteren In Vitro-Versuchen gezeigt werden konnte (n.d.), war die lyophilisierte „C“-Vakzine auch dem mit TSM versetzten konventionellen Köderimpfstoff, der als Flüssigimpfstoff vorliegt, überlegen. Wie erwartet, war die lyophilisierte Vakzine (TSM und GS 4) bei höheren Temperaturen (24°C und 37°C) stabiler als der flüssige, mit TSM-versetzte Impfstoff ($p < 0,05$). Der Virustiter fiel bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur (24°C) von ausgangs $10^{5.5}$ KID_{50}/ml auf $10^{3.5}$ KID_{50}/ml am Tag vier. Ein signifikanter Titerabfall ($p < 0,05$) innerhalb weniger Tage wurde auch bei Lagerung im Brutschrank (37°C) festgestellt. Am 6. Tag konnte hier kein Virus mehr isoliert werden (n.d.).

Abb. 11a-11d Untersuchungen zur Stabilität (Titerverlauf) des lyophilisierten „C“-Virus



Weitere Untersuchungen richteten sich auf den Vergleich der beiden Oralschutzmittel TSM und GS 4 (Abb. 11a bis 11d). Wie die statistische Auswertung zeigte, wurde bei Raumtemperatur ein signifikant ($p < 0,05$) höherer Titer des mit GS 4 lyophilisierten Virus festgestellt (Abb. 11a), weshalb bei der Herstellung der Köderformulierungen für die nachfolgenden Tierexperimente dieses Gefrierschutzmittel Verwendung fand. Die Titer für flüssige „C“-Vakzine bei Kühlschrank- und Erdbodentemperatur variierten zwischen $10^{4,75}$ KID₅₀/ml bis $10^{6,0}$ KID₅₀/ml bzw. $10^{5,1}$ KID₅₀/ml bis $10^{6,0}$ KID₅₀/ml und erwiesen sich somit als relativ stabil (siehe Abb. 8). Aus den Abb. 9 und 10 wird ersichtlich, dass auch die Lyophilisate bei 4°C stabile Titer von $10^{5,1}$ KID₅₀/ml bis $10^{6,1}$ KID₅₀/ml (GS 4) bzw. $10^{4,9}$ KID₅₀/ml bis $10^{5,75}$ KID₅₀/ml (TSM) und bei 12,6°C Werte von $10^{5,4}$ KID₅₀/ml bis $10^{5,9}$ KID₅₀/ml (GS 4) bzw. $10^{5,1}$ KID₅₀/ml bis $10^{5,75}$ KID₅₀/ml (TSM) zeigten. Bei Raumtemperatur war bei beiden Schutzmedien vom 1. bis zum 7. Tag kein Titerabfall festzustellen (TSM $10^{5,1} \rightarrow 10^{5,25}$ KID₅₀/ml; GS 4 $10^{5,6} \rightarrow 10^{5,5}$ KID₅₀/ml). Auch bei

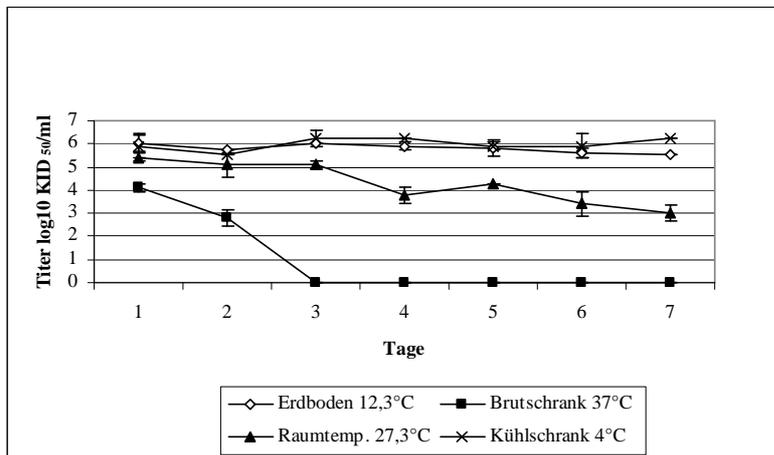
Lagerung im Brutschrank fiel der Titer innerhalb des Zeitfensters nicht deutlich mehr als um eine log-Stufe ab (TSM $10^{4,9} \rightarrow 10^{3,6}$ KID₅₀/ml, GS 4 $10^{5,5} \rightarrow 10^{4,5}$ KID₅₀/ml). Im Mann-Whitney Rank Sum-Test konnte daher innerhalb dieser sieben Tage bei beiden Oralschutzmitteln kein statistisch signifikanter Titerabfall festgestellt werden ($p > 0,05$). Die lyophilisierte „C“-Vakzine erwies sich somit in den Untersuchungen als titerstabil über den gesamten Beobachtungszeitraum und erfüllt daher ein wichtiges Kriterium für den Einsatz in der o.I. beim Schwarzwild.

4.3.2. CP7_E2alf: Vergleich der Stabilität von lyophilisierter und flüssiger Vakzine

Zur Untersuchung der Stabilität des Markerimpfstoffkandidaten CP7_E2alf wurde der gleiche Versuchsaufbau wie unter 4.3.1. beschrieben angewandt. Auch hier erfolgte ein Vergleich der Flüssigvakzine (ohne Oralschutzmittel) mit dem gefriergetrockneten Impfstoff bei Verwendung der beiden Schutzmedien (TSM/GS 4).

In den folgenden Diagrammen (Abb. 12-15) sind die Ergebnisse der Stabilitätsprüfung von CP7_E2alf enthalten.

Abb. 12 Stabilität von CP7_E2alf-Virus, flüssig ohne Oralschutzmittel



Die Stabilitätsuntersuchungen zeigten bei dem chimären Virus CP7_E2alf ähnliche Ergebnisse, wie mit dem herkömmlichen „C“-Virusstamm erzielt wurden. Auch dieses Virus erwies sich in flüssiger Form gegenüber hohen Umgebungstemperaturen ($> 20^\circ\text{C}$) als weniger stabil (Abb. 12). Erfolgte die Aufbewahrung bei $27,3^\circ\text{C}$ (Raumtemperatur), so fiel der

Virustiter (Ausgangswert $10^{6,25}$ KID₅₀/ml) der Flüssigvakzine bis zum Tag 7 auf $10^{3,0}$ KID₅₀/ml ($p < 0,05$).

Bei Lagerung im Brutschrank war bereits am zweiten Tag ein Abfall des Virustiters von $10^{4,1}$ KID₅₀/ml (am Tag 1) auf $10^{2,75}$ KID₅₀/ml zu verzeichnen und ab Tag 3 war ein Virusnachweis in der ZK nicht mehr möglich.

Abb. 13 Stabilität von CP7_E2alf-Virus, lyophilisiert mit TSM

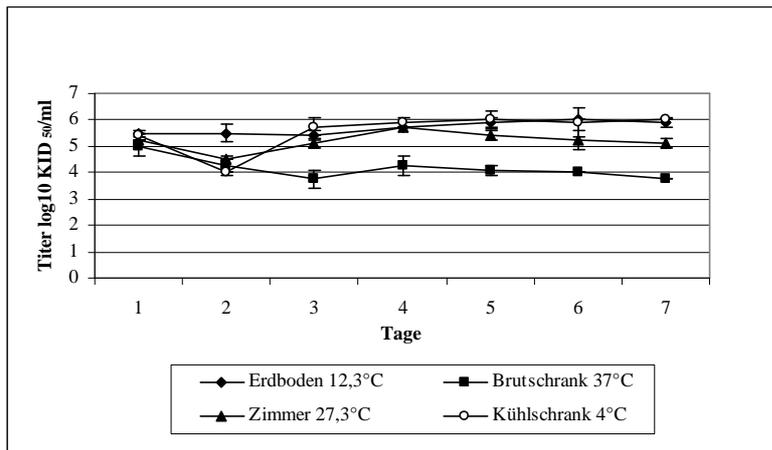
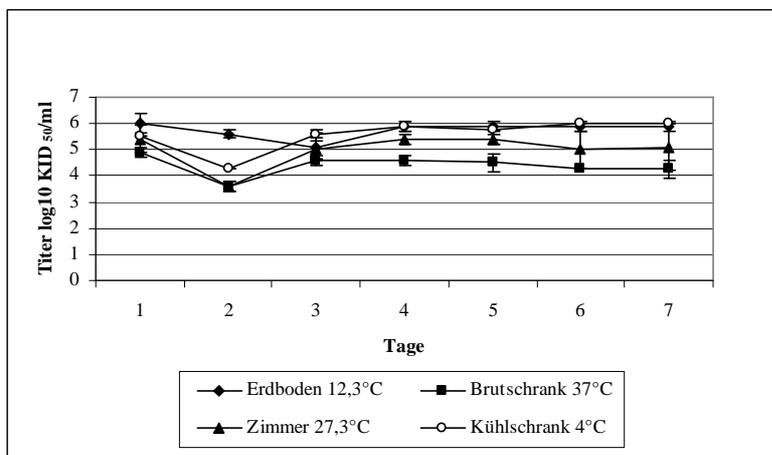


Abb. 14 Stabilität von CP7_E2alf-Virus, lyophilisiert mit GS 4

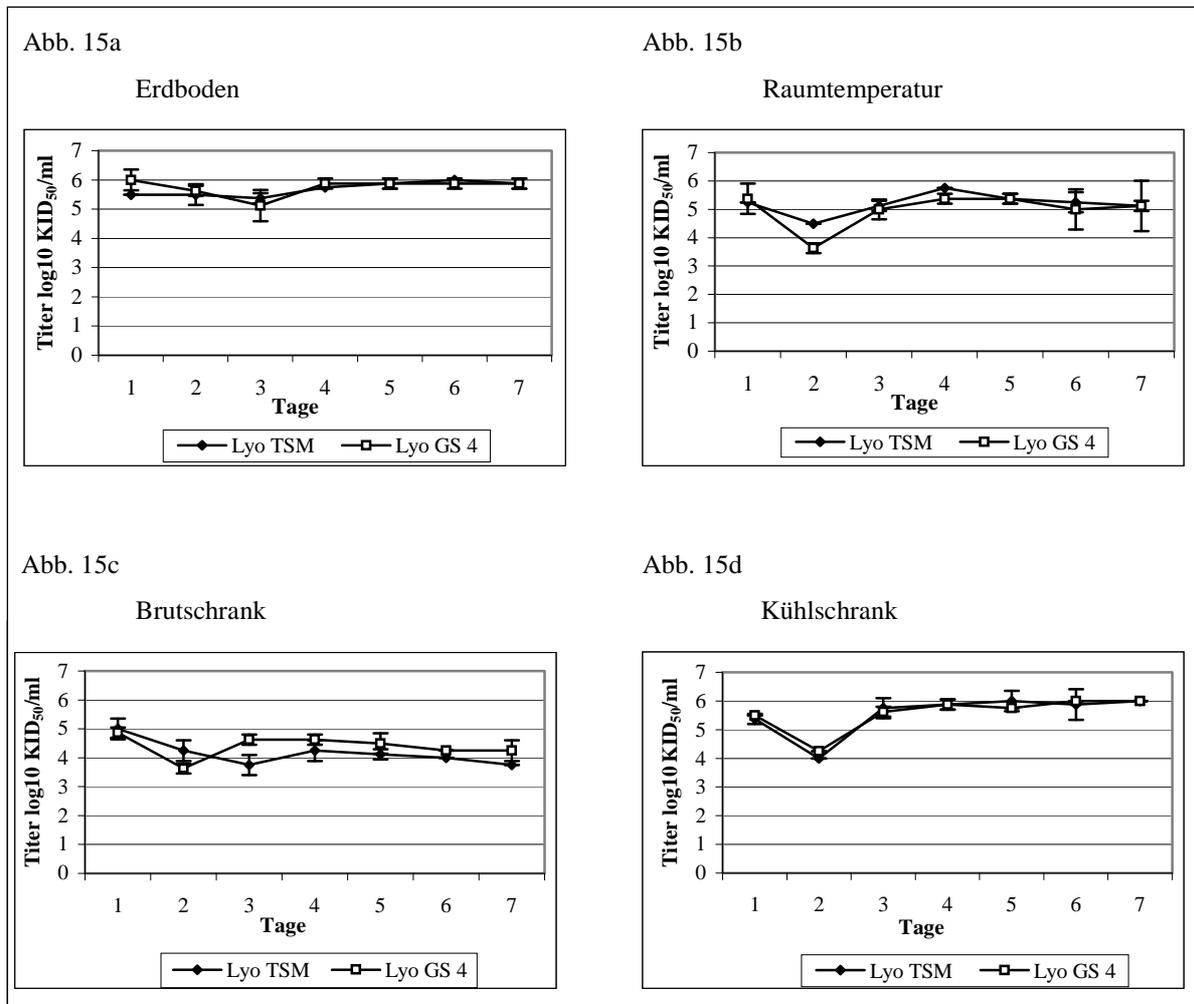


Im Vergleich mit dem Lyophilisat wird deutlich, dass dieses eine signifikant höhere Stabilität ($p < 0,05$) bei höheren Lagertemperaturen besitzt (Abb. 13 und 14).

Bei einer Gegenüberstellung von Lyophilisat (TSM/GS 4) und Flüssigimpfstoff wurden statistisch signifikante Unterschiede bei Raumtemperatur (für einen 7-Tageszeitraum) und bei 37°C ($p < 0,05$) detektiert. CP7_E2alf übertrifft in Analogie zur „C“-Vakzine in gefriergetrockneter Form (Abb. 13 und 14) die Stabilität von Flüssigimpfstoff (Abb. 12) und ist somit in diesem Punkt ein besser geeigneter Kandidat für die o.I. der Wildschweine. Wie

die Abb. 15a bis 15d zeigen, konnten zwischen beiden verwendeten Oralschutzmitteln keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$).

Abb. 15a-15d Untersuchungen zur Stabilität (Titerverlauf) des lyophilisierten CP7_E2alf-Virus



Die Titer für den flüssigen Markerimpfstoff bei Kühlschrank- und Erdbodentemperatur (Abb. 15) variierten innerhalb der 7 Tage zwischen $10^{5,5}$ KID₅₀/ml bis $10^{6,25}$ KID₅₀/ml bzw. $10^{5,5}$ KID₅₀/ml bis $10^{6,0}$ KID₅₀/ml, was bedeutet, dass diese im Prüfzeitraum stabil blieben. Auch die Lyophilisate (Abb. 13 und 14) zeigten bei 4°C stabile Titer, bei GS 4 von $10^{4,25}$ KID₅₀/ml (Tag 2) bis $10^{6,0}$ KID₅₀/ml (Tag 7) bzw. bei TSM von $10^{4,0}$ KID₅₀/ml (Tag 2) bis $10^{6,0}$ KID₅₀/ml (Tag 7). Bei 12,6°C wurden unter Verwendung von GS 4 als Trockenschutzmittel Titer von $10^{5,1}$ KID₅₀/ml (Tag 1) bis $10^{6,0}$ KID₅₀/ml (Tag 7) bzw. bei TSM von $10^{5,4}$ KID₅₀/ml (Tag 1) bis $10^{6,0}$ KID₅₀/ml (Tag 7) ermittelt. Wird dem flüssigen Virus TSM hinzugesetzt, verbessert sich ebenfalls die Stabilität der Vakzine im Vergleich

zum Flüssigvirus ohne Oralschutzmittel (n.d.). So beträgt der Virustiter bei mit TSM versetztem CP7_E2alf-Virus bei Aufbewahrung im Brutschrank am 3. Tag $10^{4,0}$ KID₅₀/ml, während bei flüssigem CP7_E2alf ohne TSM zu diesem Zeitpunkt bereits kein Virus mehr nachweisbar ist.

Am 5. Tag lag der Titer mit TSM als Schutzmittel bei $10^{2,7}$ KID₅₀/ml, während am Tag 6 keine Virusanzucht (VAZ) mehr möglich war (n.d.).

Bei Raumtemperatur sowie Lagerung im Erdboden und im Kühlschrank waren keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen TSM-Flüssigvakzine und Impfstoff ohne TSM vorhanden (n.d.).

Im Brutschrank aufbewahrtes GS 4-Lyophilisat von CP7_E2alf (Abb. 14) war signifikant stabiler ($p < 0,05$) als der Flüssigimpfstoff mit TSM-Zusatz (n.d.).

Bei Raumtemperlagerung war bei beiden Schutzmedien vom 1. bis zum 7. Tag kein Titerabfall festzustellen (TSM $10^{5,25} \rightarrow 10^{5,1}$ KID₅₀/ml; GS 4 $10^{5,4} \rightarrow 10^{5,1}$ KID₅₀/ml). Auch bei Lagerung im Brutschrank fiel der Titer innerhalb der 7 Tage nicht deutlich mehr als eine log-Stufe ab (TSM $10^{5,0} \rightarrow 10^{3,75}$ KID₅₀/ml, GS 4 $10^{4,9} \rightarrow 10^{4,25}$ KID₅₀/ml), d.h. diese Titerunterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass lyophilisiertes Impfvirus (gleich ob „C“-Virus oder der Markervakzinekandidat CP7_E2alf) unter Praxisbedingungen eine sehr gute Stabilität (Haltbarkeit) aufweisen sollte, so dass bei Einsatz dieser Konfektionierungsformen für die o.I. und deren korrekter Durchführung (siehe Kapitel 2.5.3.5.) innerhalb der 5tägigen Aufnahmeperiode bis zum Absammeln der Köder die Impfstoffköder noch ausreichend protektives Ag für eine erfolgreiche Immunisierung enthalten sollten.

Um zu überprüfen, ob lyophilisierte „C“-Vakzine und CP7_E2alf Schweine vor einer tödlichen KSPV-Infektion schützt und somit eine o.I. der Wildschweine mit dem neuen Köder auch unter Feldbedingungen möglich wird, schlossen sich Tierversuche an, in denen die Schweine mit unterschiedlichen Virusmengen belastet wurden (100, 1.000, 1.000.000 KID₅₀/ml).

4.4. Tierexperimentelle Studien

4.4.1. Untersuchungen zur Wirksamkeit von flüssiger und lyophilisierter „C“-Stamm-Vakzine bei Haus- und Wildschweinen

4.4.1.1. Wirksamkeit nach geringer Belastungsinfektion (100 KID₅₀/ml)

4.4.1.1.1. Versuchsaufbau

4.4.1.1.1.1. Ziel des Versuchs

Ziel des Versuchs war es, den Immunisierungserfolg von lyophilisiertem „C“-Virus, verpackt in einem neuen kugelförmigen, 3 cm großen Köder, im Vergleich mit dem herkömmlichen Köderimpfstoff, der die Vakzine in flüssiger Form enthält, zu überprüfen. Es galt zu untersuchen, ob die Tiere nach Infektion klinisch an KSP erkranken und ob Challengevirus ausgeschieden wird.

4.4.1.1.1.2. Tiermaterial

Der Versuch bestand insgesamt aus 18 Tieren, darunter vier Wildschweinen im Alter von 7 Monaten. Bei den übrigen Tieren handelte es sich um Hausschweine (Deutsches Edelschwein x Deutsche Landrasse x F1 aus einem Mastbetrieb in Vorpommern) im Alter von 5 bis 7 Monaten. Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn im VNT negativ auf neutralisierende Ak gegen KSP, BDV, BVD1 und BVD2 getestet.

4.4.1.1.1.3. Vakzination

Die Vakzination der Tiere erfolgte in Gruppe 1 (Wildschweine, OM 276, 278, 270, 271) mit dem beschriebenen kugelförmigen Köder und zwei Impfdosen (ID) lyophilisierter „C“-Vakzine (KSP-C-714/5 III, mit GS 4). Dies entspricht 1,8 ml Impfstoff mit einem Titer von 10^{5,75} KID₅₀/ml. Die Gruppe 2 (Hausschweine, 7 Monate alt, OM 31, 32, 33, 34) erhielt ebenfalls den oben beschriebenen Köder mit 2 ID Lyophilisat vom „C“-Virus (Titer 10^{5,75} KID₅₀/ml).

Hausschweine der dritten Gruppe (6 Monate alt, OM 296, 297, 298, 299) wurden mit dem kugelförmigen Köder und einer ID Lyophilisat (entspricht 0,9 ml Impfstoff, Titer $10^{5,75}$ KID₅₀/ml) vakziniert, während die vierte Gruppe (Hausschweine, 5 Monate alt, OM 292, 293, 294, 295) mit dem Riemser Schweinepestoralimpfstoff (konventioneller Köder, flüssige Vakzine, Charge 490404, Titer $10^{5,75}$ /ml) der RIAM oral immunisiert wurde.

4.4.1.1.1.4. Challenge

Zwei empfängliche Hausschweine (5 Monate alt, OM 505, 506, Gruppe 5) dienten als Infektionskontrollen. Sie wurden zusammen mit den immunisierten Schweinen (28 dpv) mit einer niedrigen infektiösen Dosis VB (100 KID₅₀/ml) des Virusstammes „Alfort 187“ intranasal infiziert (Dosis: 1ml), um eine Feldinfektion zu imitieren. Die Verabreichung des Challengevirus erfolgte langsam und zu gleichen Teilen in jedes Nasenloch, wobei im Anschluss daran die Rüsselscheibe mit einem Desinfektionstuch gereinigt wurde. Nach Infektion erfolgte eine tägliche klinische Kontrolle. Die Tiere verblieben während der Vakzinationsphase im Quarantänestall der Forschungseinrichtung. Ungefähr eine Woche vor Infektion erfolgte die Umsetzung der Schweine in den Hochsicherheitstrakt. Nach dem Umsetzen, d.h. noch vor der Infektion, begann das tägliche Messen der Rektaltemperatur, wobei Fieber als eine Temperaturerhöhung auf $\geq 40,5^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von mindestens zwei Tagen definiert wurde.

4.4.1.1.1.5. Probenahme

Während der Vakzinationsphase wurde den Tieren am Tag der Impfung sowie 7 und 14 dpv Blut für die Serumgewinnung entnommen. Die Wildschweine wurden zur stressfreien Beprobung sediert (Zoletil® 6-9 mg/kg i.m.). 0, 3, 5, 7, 12, 27 dpi wurden sowohl EDTA-Blut als auch Nasen- und Konjunktivalsekret sowie Speichel und Kot mittels Tupferproben gewonnen, um eine Virusausscheidung nachzuweisen. Blut zur Serumgewinnung wurde 7, 12 und 27 dpi entnommen. Die VB-Proben wurden zur Messung des Blutbildes sowie zur Präparation der Leukozytenfraktion (BC) genutzt, letztere um eine Virämie nachzuweisen. VB wurde ebenfalls in der RT-PCR untersucht. 27 dpi erfolgte die Tötung aller überlebenden Tiere sowie die pathologisch-anatomische Untersuchung. Organproben wurden von Tonsille, Milz, Niere, Mandibularlymphknoten (MLK), DLK und Lunge entnommen und virologisch untersucht (VI, RT-PCR, Real-Time PCR der Tonsillen).

Weiterhin erfolgte das Anfertigen von KM-Ausstrichen mit anschließender Untersuchung auf KSPV-Ag mittels IIFT. Moribunde Tiere wurden bereits vor Versuchsende getötet.

4.4.1.1.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Hausschweine fraßen die Köder komplikationslos bis auf ein Schwein aus Gruppe 4 (OM 293). Diesem Tier wurde daher der Flüssigimpfstoff mit Hilfe einer Spritze ins Maul appliziert.

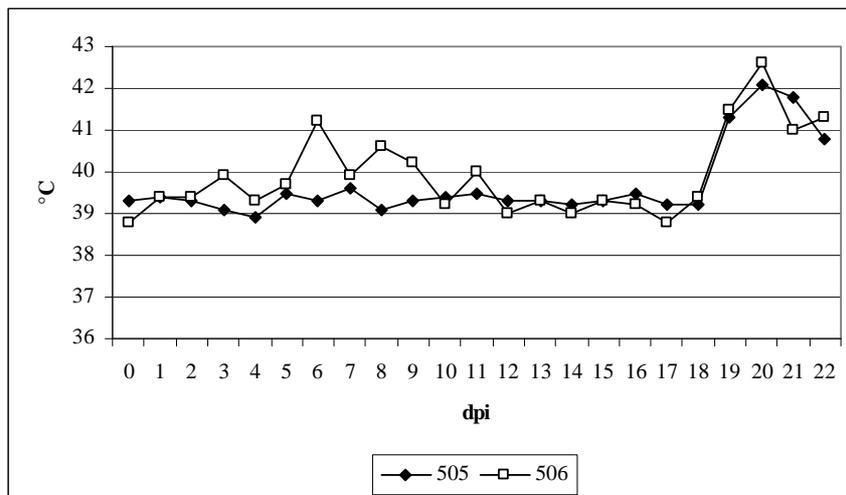
Die Wildschweine nahmen die Köder sehr zögerlich auf, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass die Tiere nicht vorher an Mais bzw. Placeboköder gewöhnt waren.

4.4.1.1.2.1. Klinisches Bild pv und pi

Die Schweine zeigten während der Vakzinationsphase keine Auffälligkeiten und blieben erwartungsgemäß klinisch gesund. Eine Temperaturerhöhung konnte nicht festgestellt werden.

Nach Challenge wurde bei einigen vakzinierten Tieren eine gering erhöhte Rektaltemperatur festgestellt (2 dpi OM 31 40,0°C; 13 dpi OM 294 40,4°C; 18 dpi OM 292 sowie 294 40,1°C und 19 dpi OM 294 40,1°C). Diese kurzzeitigen Temperaturerhöhungen erstreckten sich meist nur über einen Tag und traten solitär ohne klinische Symptome auf. Die Tiere zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden sowie eine normale Futteraufnahme. Die restlichen vakziniert-infizierten Schweine blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum gesund. Lediglich durch die häufige Tupferprobenentnahme am Auge, entwickelten einige Tiere ab dem dritten Beprobungstag eine ggr. bis mgr. Konjunktivitis (OM 292, 295, 296, 297, 298, 31, 32, 33). Die Infektionskontrollen zeigten erst sehr spät (ab 19. dpi) Fieber, was vermutlich auf die geringe Challenge-Dosis von 100 KID₅₀ zurückzuführen ist. Am 20. dpi erreichte das Fieber mit 42,6°C (OM 506) und 42,1°C (OM 505) seinen Höhepunkt. Bis zum Tag der Sektion sank die Rektaltemperatur auf 41,3°C (OM 506) bzw. 40,8°C (OM 505), siehe Abb. 16.

Abb. 16 Rektaltemperaturen, Infektionskontrollen

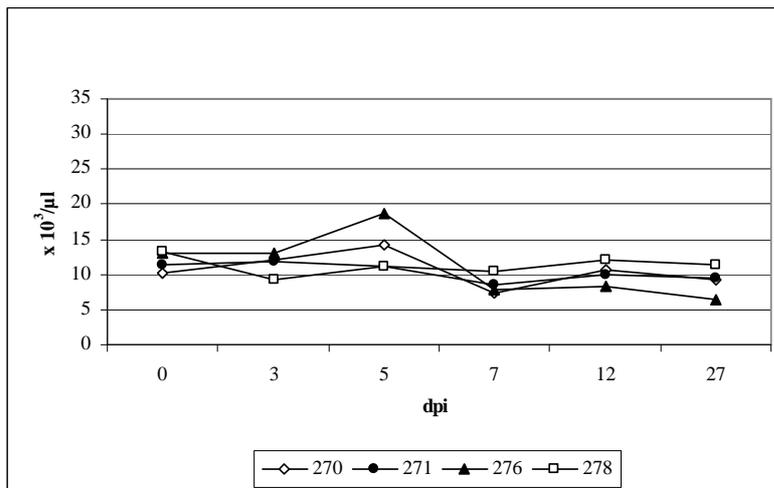


Die Infektionskontrollen zeigten ab dem 3. dpi eine verminderte Futteraufnahme und eine ggr. Apathie, während die OM 506 zusätzlich breiigen Kot absetzte. Ab Tag 5 pi hatten beide Tiere außerdem Husten und wiesen eine erhöhte Atemfrequenz auf. 21 Tage nach Challenge lag das Schwein 505 fest, hustete stark, fraß nicht mehr und hatte an der seitlichen Bauchwand sowie an der äußeren Seite der Vorderextremitäten zahlreiche petechiale Blutungen. Die zweite Infektionskontrolle (OM 506) wies einen ähnlichen klinischen Zustand auf, jedoch ohne festzuliegen.

4.4.1.1.2.2. Leukozytenwerte

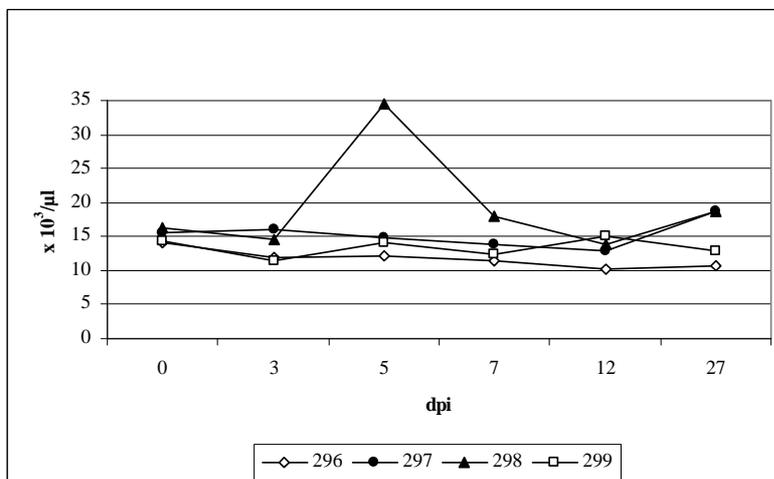
Wie aus den Abb. 17-20 ersichtlich wird, lagen die Leukozytenwerte der meisten vakzinierten Tiere im Referenzbereich von 10.000-22.000 Zellen pro μ l Blut (Kraft und Dürr, 1999).

Abb. 17 Leukozytenwerte, Gruppe 1 (Wildschweine), Lyophilisat (2 ID)



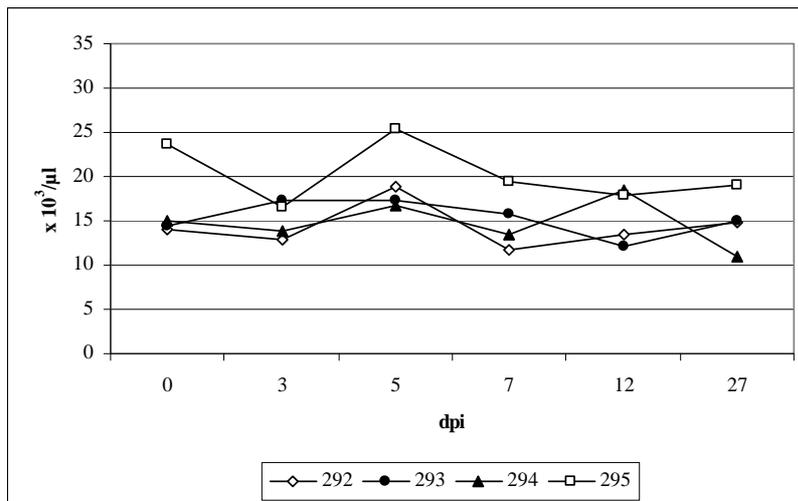
In Gruppe 1 zeigten die Schweine 270 und 271 am 7. dpi eine ggr. Leukopenie. Das Tier 276 wies am 7., 12. und 27. dpi ggr. erniedrigte Leukozytenwerte auf (Abb. 17). Alle Tiere waren jedoch klinisch unauffällig und KSPV konnte auch an keinem Tag isoliert werden. Zwei weitere Tiere waren durch eine Leukozytose auffällig.

Abb. 18 Leukozytenwerte, Gruppe 3 (Hausschweine), Lyophilisat (1 ID)



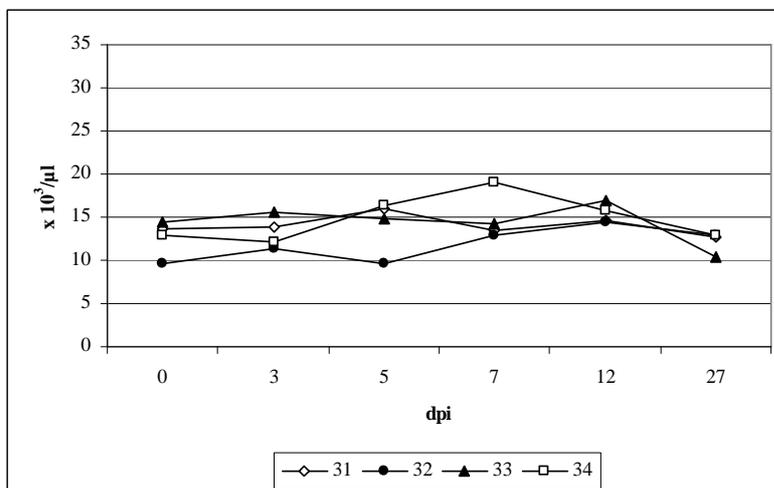
Das Schwein mit der OM 298 (Gruppe 3) hatte am Tag 5 Leukozytenwerte von $34,4 \times 10^3$ Zellen/µl Blut (Abb. 18). Dieser Wert stand in keinem kausalen Zusammenhang zum klinischen Bild, da außer einer lokalen Entzündung im Oberkieferbereich, keine weiteren pathologisch-anatomischen Veränderungen vorhanden waren.

Abb. 19 Leukozytenwerte, Gruppe 4 (Hausschweine), Flüssigimpfstoff



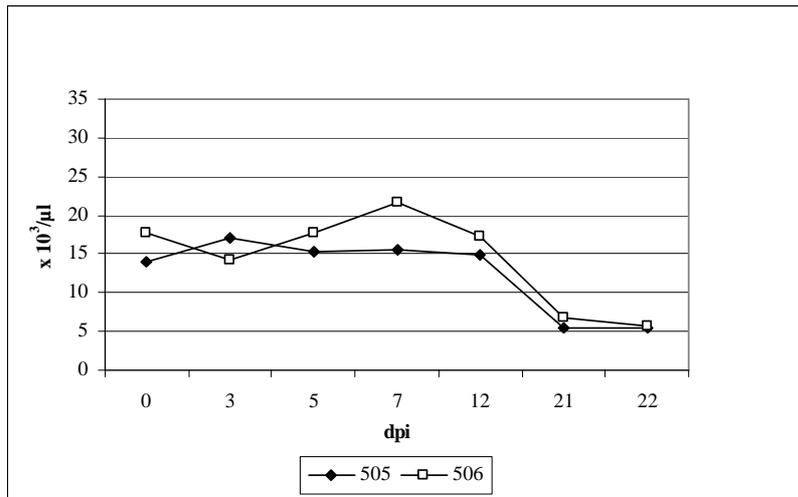
Bei Schwein Nummer 295 (Gruppe 4) konnte am 0. und 5. dpi eine Erhöhung des Leukozytengehaltes im Blut festgestellt werden (Abb. 19), möglicherweise im ursächlichen Zusammenhang mit einer Verletzung (Entzündung) des Rektums stehend, hervorgerufen durch das tägliche Thermometrieren.

Abb. 20 Leukozytenwerte, Gruppe 2 (Hausschweine), Lyophilisat (2 ID)



Die Blutwerte der Hausschweine aus Gruppe 2 lagen im Referenzbereich (Abb. 20).

Abb. 21 Leukozytenwerte, Gruppe 5 (Hausschweine), Infektionskontrollen



Die Infektionskontrollen zeigten ab Tag 21 einen deutlichen Abfall der Leukozytenzahlen (Abb. 21). Am 12. dpi lagen die Werte mit $14,8 \times 10^3$ Zellen/ μl Blut (OM 505) bzw. $17,3 \times 10^3$ Leukozyten/ μl Blut (OM 506) im Normbereich, während sie am 21. dpi auf $5,47 \times 10^3$ Zellen/ μl Blut (OM 505) und $6,78 \times 10^3$ / μl Blut (OM506) in den leukopenischen Bereich fielen.

4.4.1.1.2.3. Virologische Befunde

Die VI aus dem Blut verlief bei allen vakzinierten Schweinen negativ. Ein Nachweis von Challenge-Virus aus NT, AuT, SpT, sowie KT war ebenfalls nicht möglich (Tab. 3).

Tab. 3 VI aus BC und Tupfermaterial

Gruppe	BC	Nasentupfer	Augentupfer	Speicheltupfer	Kottupfer
1	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
2	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
5	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2

Auch mit Hilfe der RT-PCR gelang es nicht, KSPV-Genom zu detektieren, was dafür spricht, dass die Tiere durch die Köderimpfung komplett vor einer KSPV-Infektion geschützt waren

und kein Challengevirus mittels Körperse- und Exkreten ausgeschieden wurde (n.d.).

Lediglich bei Tier Nr. 298 war die nRT-PCR am 7. dpi im NT positiv.

In der angeschlossenen Sequenzierung der Probe stellte sich heraus, dass es sich um Vakzinevirus (Stamm „C“) handelt. Die virologischen Ergebnisse der Organproben sind in den Tab. 4 und 5 zusammengefasst.

Tab. 4 VI aus Organanreibungen und KM-Ausstrichen

<i>Gruppe</i>	<i>Tonsille</i>	<i>Milz + Lymphknoten</i>	<i>Niere + Lunge</i>	<i>Knochenmark</i>
1	0/4	0/4	0/4	0/4
2	0/4	0/4	0/4	0/4
3	0/4	0/4	0/4	0/4
4	0/4	0/4	0/4	0/4
5	2/2	2/2	2/2	2/2

Tab. 5 Nachweis von viraler RNA mittels Real-Time PCR aus Tonsillarproben

<i>OM</i>	<i>TC</i>	<i>Kopien/g Tonsille</i>	<i>Bewertung</i>
293	41	542	negativ
295	38	4.612	fraglich
33	40	1381	negativ
34	39	2.364	fraglich

Sie zeigen, dass auch alle Organe negativ in der VI waren. In der Real-Time PCR aus den Tonsillen konnte bei zwei Tieren (OM 34 aus Gruppe 2 und OM 295 aus Gruppe 4) mit TC-Werten von 39 und 38 ein fragliches Ergebnis (Tab. 5) abgeleitet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Real-Time-Thresholdwerte von 35 bis 39 als fraglich beurteilt, höhere TC-Werte als negativ. Fragliche Proben wurden mit der utr-PCR abgeklärt. In den fraglichen Real-Time PCR-Proben konnte jedoch mit der utr-PCR kein KSPV-Genom nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass diese Tiere als virologisch negativ angesehen werden können. Daher wurden die Tiere mit den OM 295 und 34 als negativ bewertet. Der IIFT aus KM-Ausstrichen ergab bei allen vakzinierten Tieren ebenfalls ein negatives Ergebnis.

Anhand dieser Ergebnisse kann zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass in den vakzinierten Schweinen kein vermehrungsfähiges Virus bzw. keine KSPV-RNA mehr vorhanden war.

Bei den Infektionskontrollen (OM 505 und 506) hingegen war KSPV ab dem 21. dpi im BC nachweisbar (Tab. 3).

Bei der OM 505 war es möglich, KSPV-RNA im NT nachzuweisen (21 dpi), während die VI nicht gelang (n.d.). Am 22. dpi konnte das Challengevirus bei beiden Kontrollen in BC-Präparationen gefunden werden. Bei Tier Nr. 506 war auch ein Virusnachweis im NT möglich (Tab. 3), während bei OM 505 wiederum nur RNA vorhanden war (n.d.). Weiterhin waren alle Organanreibungen und KM-Ausstriche der Infektionskontrollen KSPV-positiv (Tab. 4).

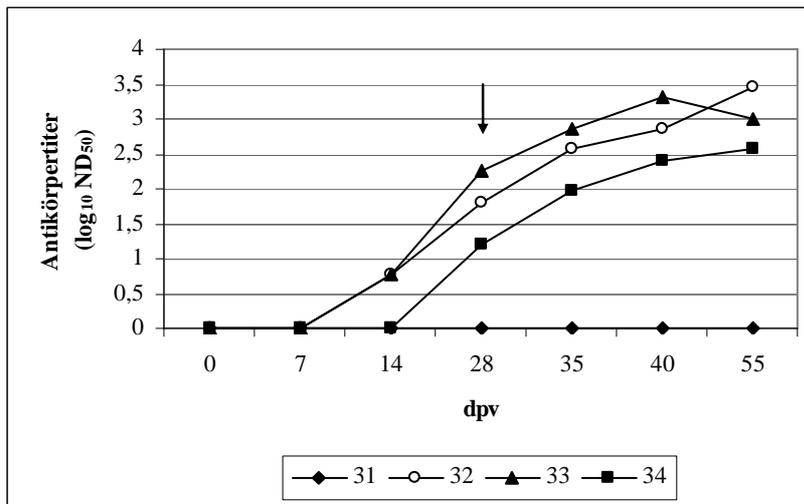
Die zusätzlichen Blutungstage (21 und 22 dpi) wurden nötig, weil die Infektionskontrollen Fieber entwickelten, was auf eine Virämie hindeutete. Zur Bewertung dieser Befunde erfolgte gleichfalls eine zusätzliche Blutentnahme bei den geimpften Tieren der gleichen Altersgruppe (5 Monate alt, OM 292, 293, 294, 295), mit virologisch negativem Ergebnis.

4.4.1.1.2.4. Serologische Befunde

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen sind in den Abb. 22-25 grafisch zusammengefasst.

Die Untersuchung der Seren im VNT zeigte, dass die ersten Ak bereits 14 dpv vorhanden waren. Bis zu diesem Tag hatten 8 (OM 271, 278, 32, 33, 294, 296, 298, 299) von 16 Tieren niedrige Ak-Titer, die sich zwischen 1:4 und 1:8 bewegten und als erste Reaktion auf die Vakzination gewertet werden können. Bis auf zwei Tiere (OM 31 aus Gruppe 2 und OM 297 aus Gruppe 3, ausgenommen der beiden Infektionskontrollen aus Gruppe 5), serokonvertierten alle Schweine bis zum 28. dpv. Der höchste Ak-Titer wurde zu dieser Zeit beim Tier mit der OM 33 aus der Gruppe 2 (Abb. 22) festgestellt, mit einem Titer von 1:181. Dieses Hausschwein wurde mit 2 ID des lyophilisierten „C“-Virus vakziniert. Statistisch signifikante Unterschiede im Ak-Titer aller Gruppen zum Zeitpunkt der Infektion konnten jedoch nicht festgestellt werden ($p > 0,05$).

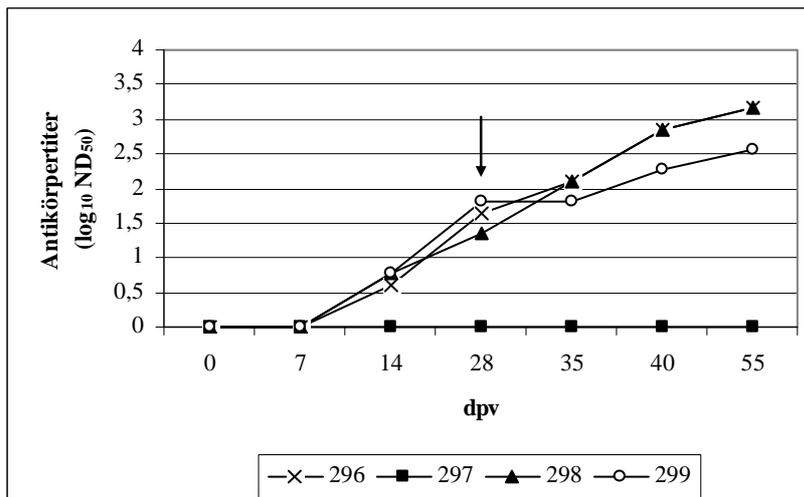
Abb. 22 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 2 (Hausschweine), Lyophilisat (2 ID)



Pfeil: Infektion

Nach der Challenge am 28. dpv kam es zu einem Anstieg der Ak-Titer bei fast allen vakzinierten Tieren. Wie bereits erwähnt und in den Abb. 22 und 23 dargestellt, serokonvertierten zwei Schweine (OM 31, OM 297) nicht, erkrankten aber auch nach Belastungsinfektion nicht an KSP („Non-Responder“), was vermutlich an einer unspezifischen und zellulärbedingten Immunität dieser Tiere lag. Möglicherweise wurde diese Situation auch durch die niedrige Infektionsdosis beeinflusst.

Abb. 23 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 3 (Hausschweine), Lyophilisat (1 ID)



Alle anderen Tiere erreichten hohe Ak-Titer, die im Mittel bei 1:513 (Gruppe 1, Abb. 24), 1:1.429 (Gruppe 2), 1:1.087 (Gruppe 3) und 1:1.261 (Gruppe 4, Abb. 25) lagen.

Abb. 24 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 1 (Wildschweine), Lyophilisat (2 ID)

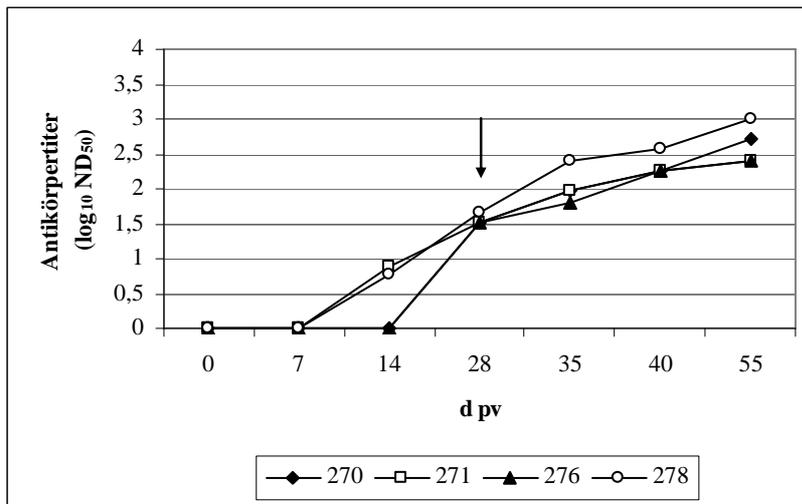
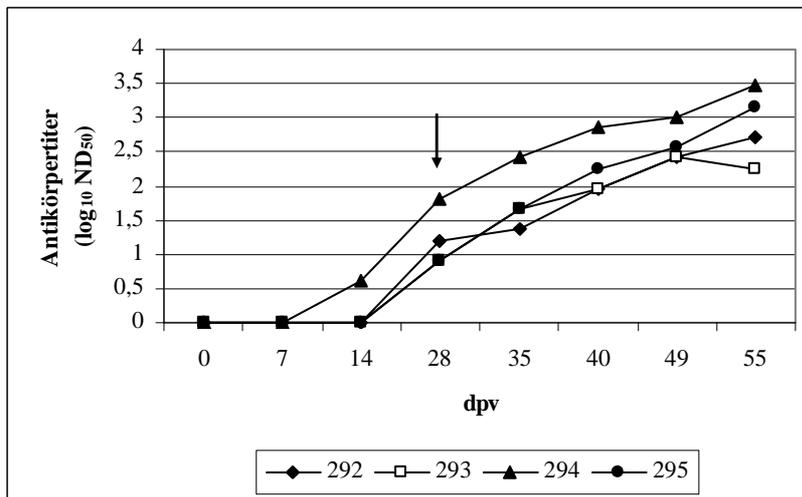


Abb. 25 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 4 (Hausschweine), Flüssigimpfstoff



Die beiden Tiere mit den höchsten Ak-Titern am 27. dpi (1:2.900) gehörten der Gruppen 2 (OM 32) und 3 (OM 298) an. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen am Tag der Sektion (55 dpv) waren nicht vorhanden ($p > 0,05$). Aber es scheint doch unterschiedliche Verläufe in der Ak-Entwicklung pi zu geben, wenn man die Steilheit der Kurven vergleicht (bezogen auf die einzelnen Gruppen).

4.4.1.1.2.5. Pathologisch-anatomische Befunde

Alle vakziniert-infizierten Tiere wiesen keine KSP-typischen pathologisch-anatomischen Veränderungen auf. Ein Tier (OM 34) zeigte eine ggr. katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie, während bei Nr. 33 Nierenbeckenzysten diagnostiziert wurden.

Es handelt sich hierbei um unspezifische Befunde, die nicht auf KSPV zurückgehen.

Am 23. dpi verendeten die Kontrollen. Bei der Sektion dieser Tiere wurden KSP-typische Läsionen festgestellt, wie hgr. gerötete Ileozäkalklappen mit fibrinösen Belägen, vereinzelt petechiale Blutungen in der Niere, hgr. geschwollene blutig durchtränkte bis marmorierte MLK und DLK sowie eine Konjunktivitis. Die OM 505 zeigte zudem Blutungen in der Serosa des Dünndarms. Bei beiden Kontrollen fanden sich keine Veränderungen an den Tonsillen und in der Milz.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass bei den vakziniert-infizierten Schweinen keine Virämie und Virusausscheidung festgestellt werden konnte. Sowohl Haus- als auch Wildschweine waren vollständig vor einer KSPV-Infektion geschützt. Challengevirus konnte an keinem Tag von den vakzinierten Tieren isoliert werden, während die Infektionskontrollen virämisch waren, Challengevirus ausschieden und unter KSP-typischen Symptomen 23 dpi verstarben. Da in diesem Experiment die Tiere nur einer relativ geringen Infektionsdosis ausgesetzt waren, stellte sich die Frage, ob der lyophilisierte Impfstoff bei einer höheren Challengedosis sicher vor einer experimentellen Infektion schützt, was in einem nachfolgenden Experiment zu überprüfen war.

4.4.1.2. Wirksamkeit nach höherer Belastungsinfektion (1.000 KID₅₀/ml)

4.4.1.2.1. Versuchsaufbau

4.4.1.2.1.1. Ziel des Versuchs

In diesem zweiten Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob der Schutz der lyophilisierten und mittels Köder verabreichten „C“-Vakzine auch bei Einsatz einer Challengedosis von 1.000 KID₅₀/ml gegeben ist.

4.4.1.2.1.2. Tiermaterial

Da keine Wildschweine aus eigener Zucht zur Verfügung standen, wurde die Studie mit Hausschweinen durchgeführt. Die 10 Tiere stammten aus dem im Kapitel 4.4.1.1.1.2. beschriebenen Betrieb und gehörten auch zur dort genannten Rasse.

4.4.1.2.1.3. Vakzination

Die 10 drei bis vier Monate alten Hybridschweine wurden in 3 Gruppen eingeteilt. Sie wurden vor Versuchsbeginn als frei von Ak gegen KSP, BDV, BVD1, BVD2 befundet. Die Vakzination erfolgte in Gruppe 1 (OM 362, 363, 365, 367) mit 2 ID (Titer $10^{5,75}$ KID₅₀/ml) des lyophilisierten „C“-Virus (KSP-C-714/5 III, mit GS 4), verpackt im kugelförmigen Köder bzw. in Gruppe 2 (OM 361, 364, 366, 368) mit 1,6 ml flüssiger „C“-Vakzine (Charge 490404) im konventionellen Köder (Titer $10^{5,5}$ KID₅₀/ml). Zwei Infektionskontrollen blieben ungeimpft (Gruppe 3: OM 544, 545) und wurden später infiziert.

Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche wurden die jeweiligen Köder an die Tiere verfüttert.

4.4.1.2.1.4. Challenge

Die Infektion erfolgte wie bereits unter 4.4.1.1.1.4. beschrieben mit dem KSPV-Stamm „Alfort 187“, wobei die Tiere mit 1 ml Virusverdünnung intranasal infiziert wurden. Nach Belastungsinfektion mit KSPV erfolgte die tägliche Kontrolle der Schweine auf KSP-spezifische Symptomatik sowie das Messen der Rektaltemperaturen.

4.4.1.2.1.5. Probenahme

Die Beprobung der Tiere erfolgte nach dem Schema, welches in Experiment 1 (siehe 4.4.1.1.1.5) beschrieben wurde. Im Unterschied zum vorherigen Versuch, fanden die letzte Blutentnahme, sowie das Sammeln von Tupferproben und die abschließende Sektion am 28. dpi statt.

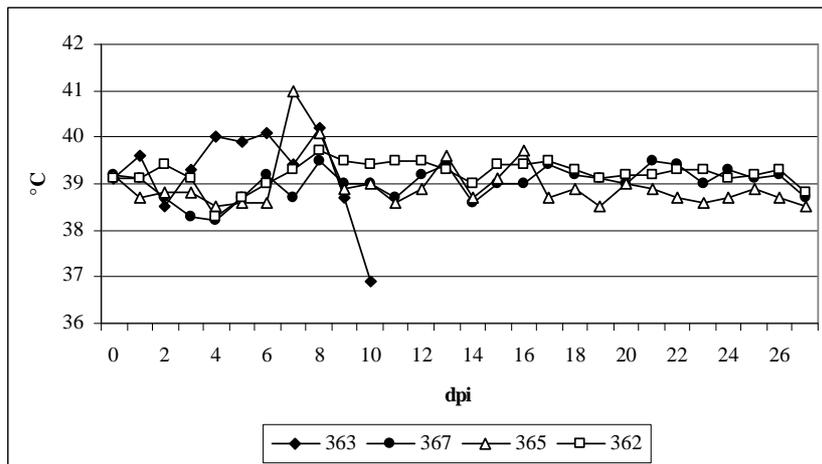
4.4.1.2.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Köderaufnahme erfolgte durch die Schweine beider Gruppen zögerlich, so dass der Flüssigimpfstoff schließlich mit einer Spritze appliziert werden musste. Einem Tier (OM 363) wurde versucht, die Lyophilisatkapsel manuell einzugeben.

4.4.1.2.2.1. Klinisches Bild pv und pi

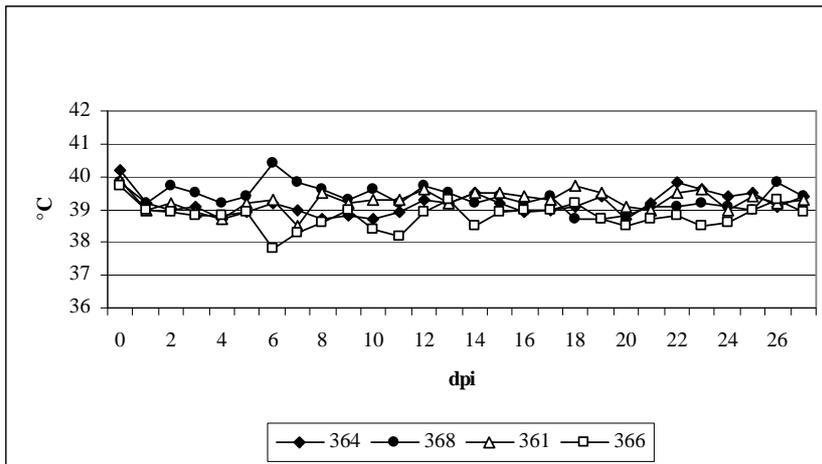
Alle Tiere blieben während der Vakzinationsphase gesund und waren klinisch unauffällig. Auf die Infektion am 28. dpv sprach das Schwein mit der OM 363 aus Gruppe 1 (Abb.26) am 4. dpi mit einer ersten Fieberreaktion (40°C) an.

Abb. 26 Rektaltemperaturen, Gruppe 1, Lyophilisat (2 ID)



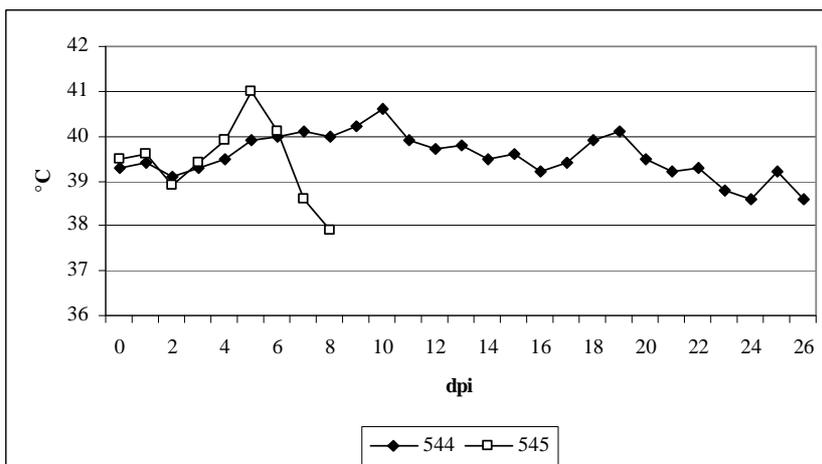
Auch am 6. und 8. dpi wurde eine erhöhte Körpertemperatur festgestellt, welche ab dem 9. dpi stark abfiel. 10 dpi hatte das Schwein nur noch eine Körpertemperatur von 36,9°C. Ab dem 7. dpi wies das Tier eine ggr.reduzierte Futteraufnahme auf, zeigte schwankenden Gang sowie Tremor. Zudem war es apathisch und hatte eine Konjunktivitis. In den folgenden drei Tagen verschlimmerten sich die Symptome. Das Schwein zeigte Inappetenz, lag fest und hatte schwere zentralnervöse Störungen (ausführen von Ruderbewegungen). Mit Nasenausfluss sowie Petechien an Ohren und Gliedmaßen wurde es im moribunden Zustand 11 dpi getötet. Das Schwein 365 hatte am 8. Tag eine erhöhte Körpertemperatur (41°C), welche am 9. Tag wieder auf Normaltemperatur sank (Abb. 26). Klinisch war dieses Tier jedoch gesund. Alle anderen vakziniert-infizierten Schweine zeigten pi ein ungestörtes Allgemeinbefinden (Abb. 26 und 27) und unauffällige Rektaltemperaturen.

Abb. 27 Rektaltemperaturen, Gruppe 2, Flüssigimpfstoff



Die Infektionskontrolle Nr. 545 entwickelte im Gegensatz dazu ab Tag 6 pi Fieber (41°C), welches bis zum Tag 9 pi auf 37,9°C fiel (Abb. 28).

Abb. 28 Rektaltemperaturen, Gruppe 3, Infektionskontrollen



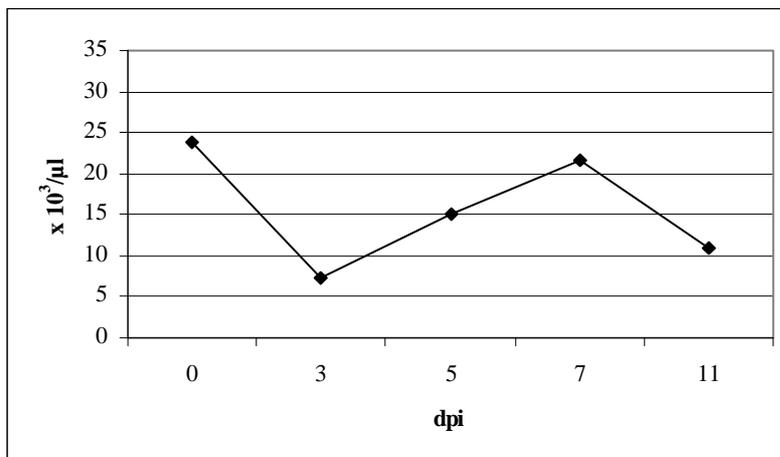
Bei diesem Schwein konnten ab 6. dpi eine reduzierte Futtermittelaufnahme und Vomitus beobachtet werden. Die Symptome verstärkten sich bei diesem Tier stetig, so dass das Schwein am 9. dpi unter KSP-typischen Symptomen verstarb (Anorexie, Apathie, ZNS-Symptome, Durchfall, Hautpetechien). Die zweite Kontrolle (Nr. 544) war über einen langen Zeitraum (6. bis 20. dpi) subfebril mit Fieberpeaks an den Tagen 11 und 20 (Abb. 28). Bei dem Tier fielen nur milde klinische Symptome auf, welche 6 dpi mit verminderter Futtermittelaufnahme und Durchfall begannen. Bis zum Tag der Sektion (27 dpi) waren eine stark reduzierte Futtermittelaufnahme, Tremor (8. dpi), Durchfall, Nasenausfluss und am 19./20. dpi eine

massive Entzündung des Rektums, hervorgerufen durch den andauernden Durchfall sowie das tägliche Thermometrieren, feststellbar.

4.4.1.2.2.2. Leukozytenwerte

Bis auf die OM 363 (Abb. 29) und die Infektionskontrollen kam es bei keinem der Tiere zu einem Abfall der Leukozytenwerte im Blut.

Abb. 29 Leukozytenwerte, OM 363, Gruppe 1, Lyophilisat



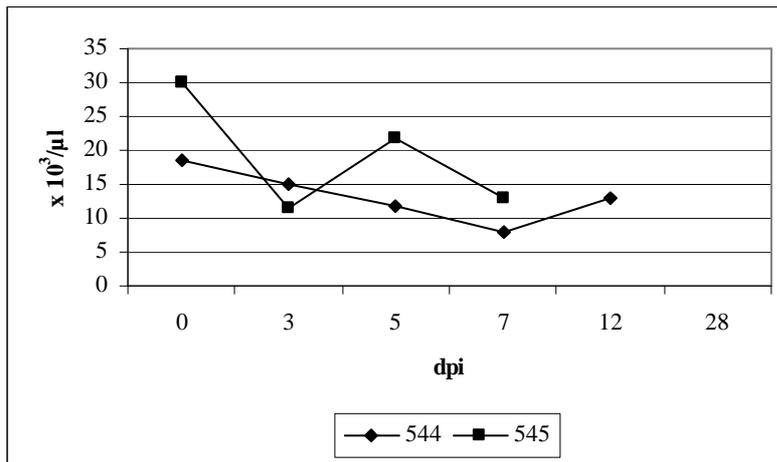
Bei dem klinisch erkrankten Schwein (OM 363) fielen die Leukozytenanzahl von 23.800 Zellen/µl Blut am Tag 0 (28 dpv = 0 dpi) auf 11.000 Leukozyten/µl Blut am Tag 11 pi (Abb. 29). Dieser drastische Abfall um mehr als die Hälfte führte zwar zu keiner Leukopenie im Sinne der Grenzwerte (<10.000/µl Blut), kann aber als deutliches Zeichen für eine Virusvermehrung in den weißen Blutkörperchen mit folgender Zerstörung der Leukozyten aufgefasst werden.

Zwei Schweine aus Gruppe 1 (OM 365) und Gruppe 2 (OM 368) wiesen am 7. dpi im Blutbild eine massive Leukozytose auf ($38,9 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut und $37,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut) (n.d.), welche bei beiden Tieren mit einer Temperaturerhöhung einher ging (siehe Abb. 26 und 27). Bei der nächsten Blutentnahme lagen die Werte wieder im Normbereich. Die Ursache für den Anstieg der weißen Blutzellen konnte nicht geklärt werden, da bei äußerlicher Adspektion der Tiere und später bei der Sektion keine makroskopischen Auffälligkeiten festgestellt werden konnten. Theoretisch können für diese Abnormität in der Leukozytenanzahl neben einer physiologischen Leukozytose durch Steigerung des Blutdrucks (Aufregung, fremde Umgebung, Tachykardie, körperliche Belastung) auch reversible pathologische Leukozytosen

nach Infektionen mit Bakterien, Pilzen, Protozoen, sowie endogene (Urämie, Diabetes mellitus) bzw. exogene Intoxikationen oder aber auch die Resorption körpereigenen Proteins (Hämatome, Muskelkrankheiten) ursächlich in Betracht kommen.

Bei beiden Infektionskontrollen war ein Abfall der Leukozytenwerte klar ersichtlich (Abb. 30).

Abb. 30 Leukozytenwerte, Infektionskontrollen



So fielen die Werte von ausgangs $29,9 \times 10^3$ Zellen/ μl Blut (0 dpi) auf $12,8 \times 10^3$ Leukozyten/ μl Blut am Tag 7 pi. bei Tier Nr. 545 bzw. von $18,4 \times 10^3$ Leukozyten/ μl Blut auf $8,05 \times 10^3$ Leukozyten/ μl Blut bei Kontrolle Nr. 544.

4.4.1.2.2.3. Virologische Befunde

Die Ergebnisse der Untersuchungen auf KSPV bzw. KSPV-Genom sind in den Tabellen 6 bis 8 dargestellt. Die Tiere aus den Gruppen 1 und 2 wurden an allen Beprobungstagen in BC, Vollblut, Organen, Tupfern mittels VI und RT-PCR negativ getestet. Nur das Tier Nr. 363 (Gruppe 1) war auffällig. Ab dem 3. dpi konnte hier KSPV aus BC-Proben isoliert werden (Tab. 6).

Tab. 6 VI aus BC und Tupfermaterial

<i>Gruppe</i>	<i>BC</i>	<i>Nasentupfer</i>	<i>Augentupfer</i>	<i>Speicheltupfer</i>	<i>Kottupfer</i>
<i>1</i>	1/4	1/4	1/4	0/4	0/4
<i>2</i>	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>3</i>	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2

Weiterhin war eine Leukopenie feststellbar ($7,38 \times 10^3$ Zellen/ μ l Blut) und KSPV-Genom war mittels nRT-PCR aus Vollblut nachweisbar. Das Tier zeigte zu diesem Zeitpunkt keine klinischen Symptome. Einen Tag später wurde eine ggr. erhöhte Körpertemperatur (40°C) ermittelt. Bis zum 11. dpi war die VI aus BC positiv, wobei es am 7. dpi erstmals möglich war, KSPV aus NT, AuT, SpT und KT zu isolieren bzw. mit der RT-PCR nachzuweisen. Auf Grund der schlechten körperlichen Kondition wurde das Tier am 11. dpi euthanasiert. Post mortem gelang es bei diesem Schwein, KSPV in allen untersuchten Organsystemen sowie in KM-Ausstrichen nachzuweisen, während alle übrigen vakziniert-infizierten Schweine virologisch negativ blieben (Tab. 7).

Tab. 7 VI aus Organanreibungen und KM-Ausstrichen

<i>Gruppe</i>	<i>Tonsille</i>	<i>Milz + Lymphknoten</i>	<i>Niere + Lunge</i>	<i>Knochenmark</i>
<i>1</i>	1/4	1/4	1/4	1/4
<i>2</i>	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>3</i>	1/2	1/2	1/2	2/2

Die Ergebnisse der Untersuchung von Tonsillen mittels Real-Time PCR sind in Tab. 8 aufgeführt. Wie daraus ersichtlich ist, gelang es auch mit dieser molekularbiologischen Diagnosemethode, KSPV-Genom beim Tier Nr. 363 nachzuweisen (TC 20).

Tab. 8 Nachweis von viraler RNA mittels Real-Time RT-PCR aus Tonsillarproben

<i>OM</i>	<i>TC</i>	<i>Kopien/g Tonsille</i>	<i>Bewertung</i>
362	34	$5,7 \times 10^4$	positiv
363	20	$9,6 \times 10^8$	positiv
366	36	$1,7 \times 10^4$	fraglich
367	33	$1,6 \times 10^5$	positiv
544	28	$4,1 \times 10^6$	positiv
545	20	$1,2 \times 10^9$	positiv

Interessanterweise waren, wie Tab. 8 zeigt, in Gruppe 1 zwei Tiere (OM 362 und OM 367) mit einer positiven Real-Time PCR auffällig. In der „normalen“ RT-PCR erwiesen sich die Tonsillen dieser Tiere jedoch als negativ. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Real-Time PCR eine höhere Sensitivität als die Standard-PCR besitzt. Tier Nr. 366 aus Gruppe 2 wies ein fragliches Ergebnis auf und konnte in der anschließenden utr-RT-PCR als negativ bewertet werden.

Die mitgeführten Kontrollschweine (OM 544, 545) entwickelten ab Tag 5 eine Virämie, während eine VI/PCR aus Tupferproben bei Tier 545 erst mit Tag 7 pi möglich war (NT, AuT, SpT). Die zweite Kontrolle (OM 544) bildete im Verlaufe des Versuchs, wie bei der Auswertung der VNT-Titer noch festzuhalten ist, Ak (40 dpv), die das Virus zu einem großen Teil neutralisierten und damit eine VI unmöglich machten. Allein am 5. und 7. dpi gelang der KSPV-Nachweis im VB.

4.4.1.2.2.4. Serologische Befunde

Die Untersuchung der Blutseren im VNT zeigte, dass bereits ab dem 14 dpv die meisten Schweine einen ggr. Anstieg an neutralisierenden Ak aufwiesen (Abb. 31 und 32).

Abb. 31 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 1, Lyophilisat (2 ID)

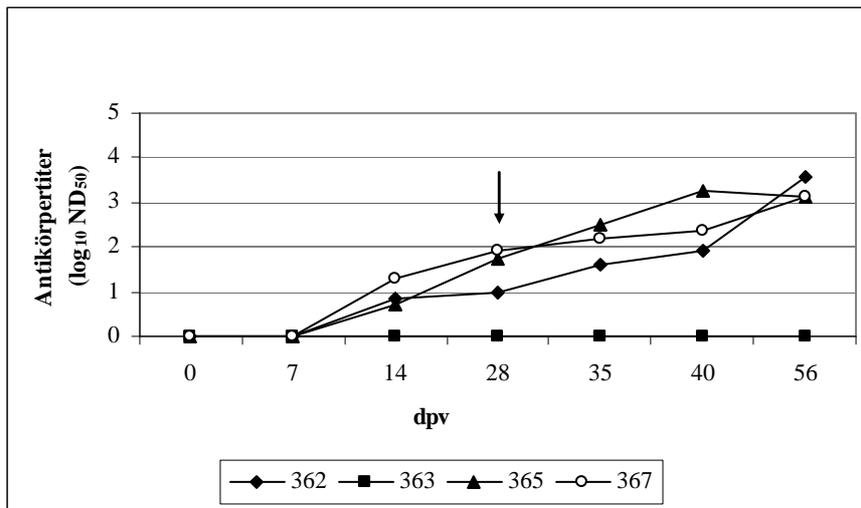
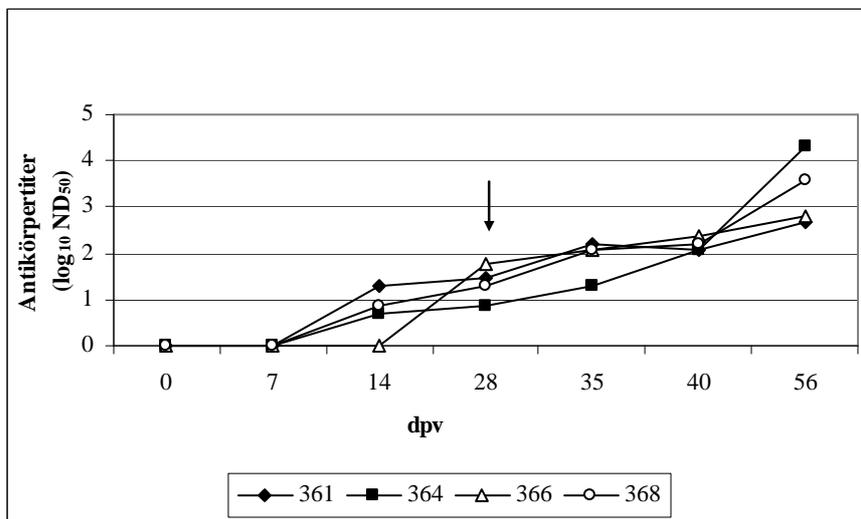


Abb. 32 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 2, Flüssigimpfstoff

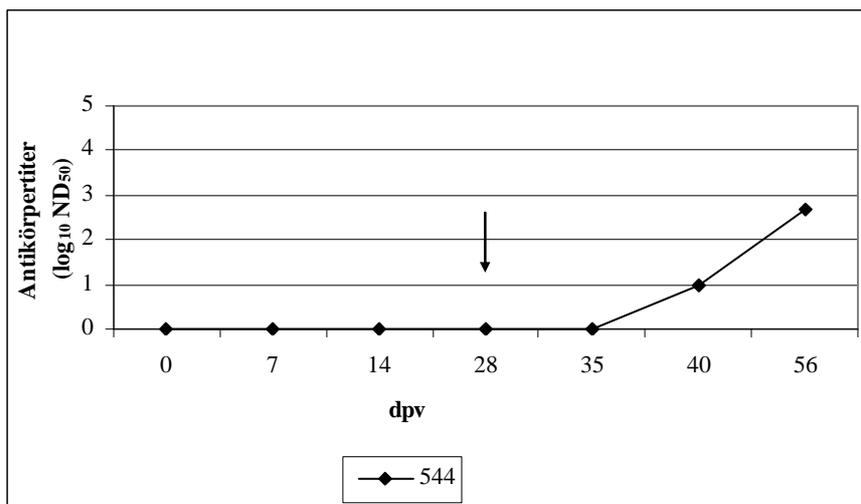


Bis zu diesem Tag hatten sechs (OM 361, 364, 368, 362, 365, 367) von acht Tieren niedrige Ak-Titer zwischen 1:5 und 1:20. Wie aus den Abb. 31 und 32 ersichtlich, serokonvertierten bis zur Challenge sieben von acht oral immunisierten Schweinen. Nur das Schwein mit der OM 363 blieb im VNT erwartungsgemäß (keine aktive Köderaufnahme) bis zum Tode negativ. Innerhalb der beiden Vakzinierungsgruppen wies zum Zeitpunkt der Infektion das Schwein Nr. 367, welches das lyophilisierte Vakzinevirus erhielt, mit 1:80 den höchsten Titer auf. Statistisch signifikante Unterschiede im Ak-Titer beider Gruppen konnten 28 dpv nicht festgestellt werden ($p > 0,05$). Wie in den Abb. 31 und 32 zu sehen ist, kam es ab Tag 28 pv zu einem Anstieg der Ak-Titer bei allen „exakt vakzinierten“ Schweinen. In beiden Gruppen wurden zum Ende des Versuchs hohe Ak-Spiegel erreicht, im Mittel Werte zwischen 1:1.983

(Gruppe 1) und 1:6.312 (Gruppe 2). Der höchsten Titer mit 1:20.529 wurde bei Tier Nr. 364 (Gruppe 2) ermittelt, welches den Flüssigimpfstoff im konventionellen Köder zu fressen bekam. Signifikante Titerunterschiede zwischen den Gruppen am Tag der Sektion (56 dpv) konnten statistisch nicht verifiziert werden ($p > 0,05$).

In Abb. 33 ist die Ak-Entwicklung der Infektionskontrolle 544 dargestellt, die am 40. dpv einen Ak-Titer von 1:10 aufwies und 55 dpv (Tag der Sektion) Werte von 1:453 erreichte.

Abb. 33 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 3, Infektionskontrolle



4.4.1.2.2.5. Pathologisch-anatomische Befunde

Die Obduktion der Versuchstiere verlief bei den vakziniert-infizierten Schweinen, bis auf das Tier mit der OM 363, ohne besonderen Befund (o.b.B.). Lediglich bei einem Tier zeigten sich Milkspots in der Leber (OM 368), die auf einen Befall mit *Ascaris suum* hinweisen.

Das Tier mit der OM 363, welches den Impfstoffköder nicht exakt aufnahm, wies bei der Sektion mgr. geschwollene und blutig marmorierte Lymphknoten, Tonsillarnekrösen, eine ggr. Petechiation auf Herz und Harnblase, eine ggr. katarrhalische Jejunitis sowie eine katarrhalische Spitzenlappenpneumonie und petechiale Blutungen an Extremitäten und Ohren auf, so dass in Verbindung mit den klinischen Symptomen die Diagnose KSP gestellt werden konnte.

Bei den Infektionskontrollen traten oben beschriebene deutliche KSP-typische Veränderungen nur bei dem Schwein Nr. 545 auf. Das zweite Kontrolltier wies weniger deutliche Organveränderungen auf, wie ggr. geschwollene Lymphknoten, vereinzelte Petechien in der

Harnblase, eine kruppöse Pneumonie im Bereich des Spitzenlappens sowie eine ggr. katarrhalische Jeunitis mit diphtheroiden Auflagerungen in Nähe der Ileozäkalklappe.

Eine zusammenfassende Betrachtung der Versuchsergebnisse lässt erkennen, dass es auch bei Belastung der Tiere mit höherer KSPV-Dosis (1.000 KID₅₀/ml) nicht gelang, eine klinische KSP-Erkrankung zu provozieren. Die vakzinierten Schweine waren nicht virämisch und schieden kein Challengevirus aus. Pathologisch-anatomische Veränderungen sowie virologisch positive Ergebnisse in der VI aus Organproben konnten nicht diagnostiziert werden, so dass von einem kompletten Schutz nach Vakzination mit konventioneller und lyophilisierter „C“-Vakzine ausgegangen werden kann.

4.4.2. Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit des lyophilisierten chimären Pestivirus CP7_E2alf und der lyophilisierten „C“-Stamm-Vakzine

4.4.2.1. Versuchsaufbau

4.4.2.1.1. Ziel des Versuchs

Ziel dieses Versuchs war die Überprüfung der Wirksamkeit des lyophilisierten chimären Vakzinevirus CP7_E2alf nach oraler Verabreichung an Haus- und Wildschweine unter Verwendung eines hoch virulenten KSPV zur Challenge. Um die Effizienz dieser Wirksamkeitsprüfung exakt einschätzen zu können, wurde eine Vergleichsgruppe mitgeführt, in der Wildschweine oral mit lyophilisiertem „C“-Virus vakziniert wurden.

4.4.2.1.2. Tiermaterial

Alle Wildschweine (sechs weibliche und vier männliche Tiere) stammten aus eigener Zucht und waren zum Zeitpunkt der o.I. 4,5 Monate alt. Die drei bis vier Monate alten Hausschweine (drei weibliche und drei männliche) wurden von einem Schweinehaltungsbetrieb aus Mecklenburg-Vorpommern bezogen. Sie wurden vor Beginn der Studie medizinisch und serologisch (KSP, BDV, BVDV1, BVDV2) untersucht. Alle Versuchstiere waren klinisch gesund sowie frei von Ak gegen die genannten Pestiviren.

4.4.2.1.3. Vakzination

Die Überprüfung der lyophilisierten Markervakzine, verpackt in kugeligen, 3 cm großen Ködern, erfolgte an vier Wild- und vier Hausschweinen. Vier weitere Wildschweine erhielten zum Vergleich lyophilisierte „C“-Vakzine. Den Wildschweinen wurden vor Immunisierung, über einen Zeitraum von vier Wochen, täglich Placebo-Köder (herkömmliche Form) verabreicht, um bei der folgenden Vakzination eine gute Aufnahme des Impfstoffes zu sichern.

Die Einteilung der Tiere erfolgte in 5 Gruppen, wobei die Schweine folgendermaßen vakziniert wurden:

Die Tiere der Gruppe 1 (Wildschweine, OM 372, 375, 376, 378) und Gruppe 2 (Hausschweine, OM 261, 262, 263, 265) wurden mit der Chimäre (CP7_E2alf, $10^{5,6}$ KID₅₀/ml, plus GS 4, 2 ID) oral immunisiert, während den Tieren der Gruppe 3 (Wildschweine, OM 370, 371, 377 und 379) „C“-Virus (KSP-C-714/5 III, $10^{5,1}$ KID₅₀/ml, mit GS 4 versetzt, 2 ID) verabreicht wurde. Am Tag der Impfung wurden die Wildschweine jeweils einzeln in die Box aufgestellt, um sicherzustellen, dass jedes Tier einen Köder aufnimmt. Um Kreuzkontaminationen der Impfviren zu vermeiden, erfolgte die Vakzination in zwei separaten Ställen.

Die vierte Gruppe bildeten ungeimpfte Hausschweine (OM 246, 266), die fünfte Gruppe nicht immunisierte Wildschweine (OM 373, 374).

4.4.2.1.4. Challenge

Auf Grund einer Vereinheitlichung in der Durchführung von Tierversuchen im Rahmen des EU-Projektes „Classical Swine Fever Vaccine and Wild Boar“ wurde die Infektionsdosis für Tierexperimente auf $10^{6,0}$ KID₅₀/ml festgelegt und als Challengevirus das hoch virulente KSPV „Koslov“ ausgewählt, um ein „worst case scenario“ zu simulieren.

Die Infektion erfolgte nunmehr oronasal mit VB des Stammes „Koslov“, welches von infizierten Schweinen aus TV 17/05 stammte. Den Schweinen wurde die oben genannte Infektionsdosis, enthalten in 2 ml PBS⁻, jeweils zu 1 ml in Nase und Maulhöhle appliziert.

4.4.2.1.5. Probenahme

Durch Festlegungen im Challengeprotokoll der EU-Projektpartner wurde im Vergleich zu den Versuchen 1 und 2 (Kapitel 4.4.1.1. und 4.4.1.2.) eine geringfügig veränderte Probenahme notwendig. Die EDTA-Blutproben wurden 4, 7, 10, 14 dpv gewonnen, um eine Virämie durch Vakzinevirus nachweisen zu können, während zum Nachweis von Challengevirus Blut 0, 4, 7, 10, 14, 21, 28 dpi untersucht wurde. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 dpv sowie 0, 7, 10, 14, 21 und 28 dpi erfolgte die Serumgewinnung zwecks Ak-Nachweis (VNT, ELISA). Nach der Belastungsinfektion wurden außerdem 0, 4, 7, 10, 14, 21 und 28 dpi Tupferproben entnommen (NT, AuT, SpT, KT).

4.4.2.2. Ergebnisse und Diskussion

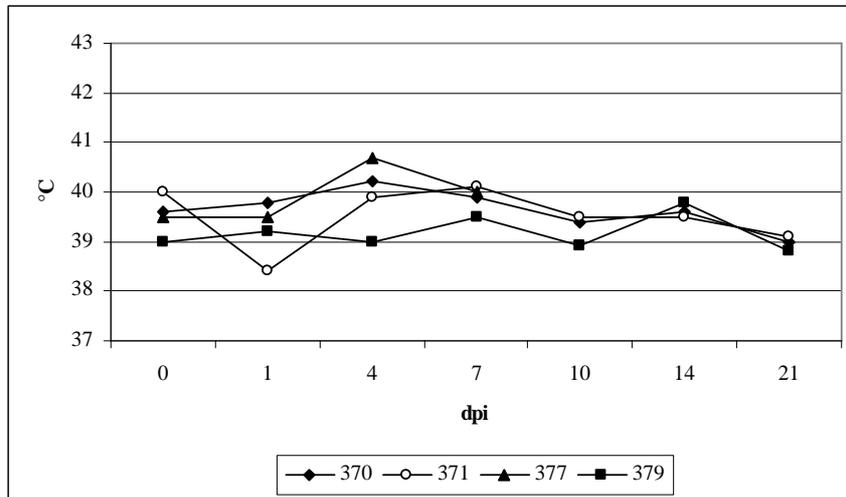
Die Vakzination verlief bei den Hausschweinen ohne Probleme, da die Tiere die Köder ohne Verzögerung aus der Hand fraßen. Bei den Wildschweinen waren es je 3 Tiere pro Gruppe, die den Köder vollständig und innerhalb kurzer Zeit aufnahmen (Gruppe 1: OM 372, 375, 378; Gruppe 3: OM 370, 371, 379). Zwei Tiere (Gruppe 1: OM 376; Gruppe 3: OM 377) nahmen keine Köder auf. Die beiden Schweine schnüffelten zwar an der Ködermasse, ließen diese aber schließlich unberührt liegen. Um die betroffenen Tiere in den Versuch zu integrieren, wurde der Köder geöffnet und versucht, diese Schweine zur Aufnahme der mit Lyophilisat gefüllten Kapsel zusammen mit einem Mais-Pellet-Gemisch zu veranlassen. Da aber auch dies nicht gelang, wurde schließlich die Vakzine enthaltende Kapsel geöffnet und das Lyophilisat über das Futter gestreut. Die Schweine haben auf diese Weise das Lyophilisat mehr oder weniger gut (siehe Ergebnisteil) aufgenommen.

4.4.2.2.1. Klinisches Bild pv und pi

Klinisch waren alle Tiere nach der o.I. o.b.B.. Bei den Hausschweinen wurde eine Woche vor Challenge täglich die Temperatur gemessen, wobei keines der Tiere in diesem Zeitraum Fieber hatte. Bei den Wildschweinen war die Bestimmung der Körpertemperatur prä infectionem nicht möglich. Erst mit dem Tag der Belastungsinfektion sowie an den folgenden Probenahme-Tagen konnte die Rektaltemperatur ermittelt werden (während der Narkose). Dafür wurden die Wildschweine mit dem Medikament Zoletil[®] für kurze Zeit betäubt.

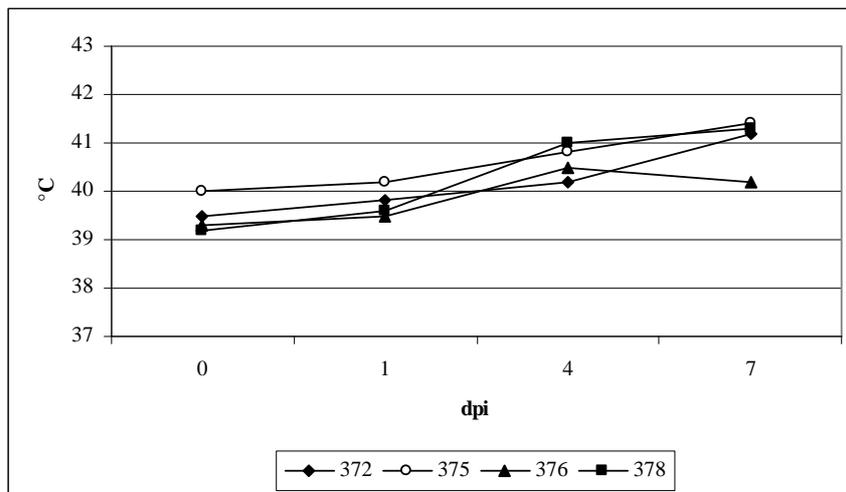
Am 4. dpi zeigte das Wildschwein Nr. 377 aus der „C“-Virus Gruppe eine Erhöhung der Körpertemperatur auf 40,7°C (Abb. 34).

Abb. 34 Rektaltemperaturen, Gruppe 3 (Wildschweine), „C“-Virus



Ab dem 4. dpi fraß das Tier schlechter. Im Verlauf der Erkrankung zeigten sich weitere klinische Symptome wie Konjunktivitis, Nasenausfluss, Apathie, Durchfall und schwankender Gang. 9 dpi verendete das Tier. Wie im Kapitel Serologie (4.4.2.2.4.) noch näher zu erläutern ist, hatte dieses Schwein im Verlauf des Versuchs keine Ak ausgebildet, was darauf hindeutet, dass es offensichtlich zu wenig Vakzineviruslyophilisat über das Futter aufgenommen hatte (siehe Anmerkungen zur Köderaufnahme). Die übrigen mit „C“-Virus oral vakzinierten Schweine blieben bis zum Versuchsende gesund, abgesehen von einer kurzzeitigen Temperaturerhöhung bei Tier Nr. 370 (40,2°C) am 4. dpi.

Abb. 35 Rektaltemperaturen, Gruppe 1 (Wildschweine), CP7_E2alf



Die mit der Chimäre CP7_E2alf immunisierten Wild- und Hausschweine waren nicht vor KSP geschützt und erkrankten. Die Wildschweine entwickelten ab dem 4. dpi Fieber (bis zu 41°C, OM 378), welches bis zum nächsten Blutungstag anstieg (z.B. auf 41,4°C bei Tier Nr. 375). Weitere Details zur Entwicklung des Fiebers sind Abb. 35 zu entnehmen. Klinische Symptome stellten sich ebenfalls am 4. dpi ein. Alle Tiere entwickelten eine hgr. zum Teil eitrig Konjunktivitis. Sie wurden apathisch, zeigten Inappetenz, wiesen Durchfall auf, erbrachen und kamen schließlich zum Festliegen. Drei Tiere (OM 372, 375, 376) starben 9 dpi während das Schwein mit der OM 378 bereits am 7. dpi während der Blutentnahme verendete.

Die Hausschweine zeigten ab dem 3. dpi, wie aus Abb. 36 hervorgeht, hohes Fieber, welches bis zu ihrem Tod anhielt. Beginnend mit dem 1. Fiebertag, stellte sich bei zwei Tieren (OM 262, 265) breiiger Durchfall ein. Die Tiere fraßen immer schlechter, erbrachen, entwickelten eitrig Konjunktividen und Nasenausfluss sowie zentralnervöse Symptome (Tremor, Ataxie). Am 9. dpi verendete Schwein Nr. 261, Tier Nr. 265 am 12. dpi, Schwein Nr. 262 am 14. dpi und am 15. dpi Tier Nr. 263 mit KSP-typischen Symptomen.

Abb. 36 Rektaltemperaturen, Gruppe 2 (Hausschweine), CP7_E2alf

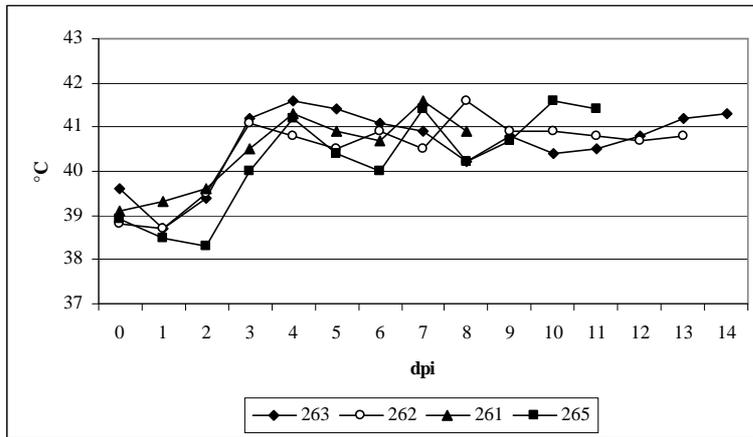
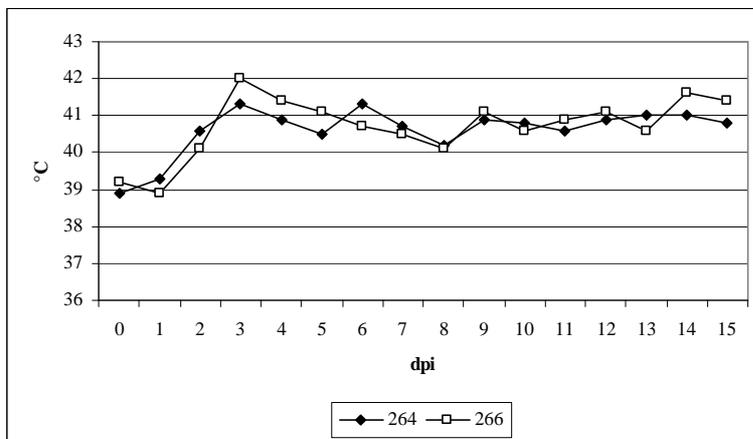


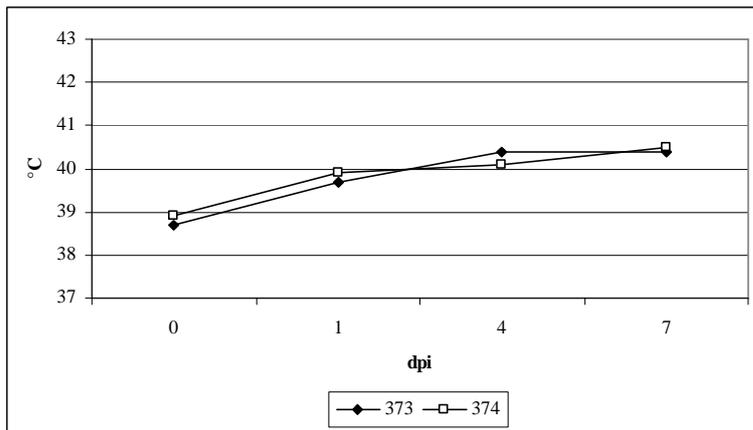
Abb. 37 zeigt, dass die Hausschweine-Kontrollen ebenfalls am Tag 3 pi sehr hohes Fieber hatten, verbunden mit den ersten klinischen Symptomen (reduzierte Futteraufnahme, Durchfall etc.). 15 Tage pi wurden beide Hausschweine im moribunden Zustand getötet. Sie lagen zu dem Zeitpunkt fest und waren stark abgemagert.

Abb. 37 Rektaltemperaturen, Gruppe 4, Infektionskontrollen (Hausschweine)



Bei den Wildschweinen (Abb. 38) war am 4. dpi eine Temperaturerhöhung festzustellen, die ihr Maximum am Tag 7 mit 40,5°C erreichte (OM 374). Die Wildschweine verendeten 9 dpi.

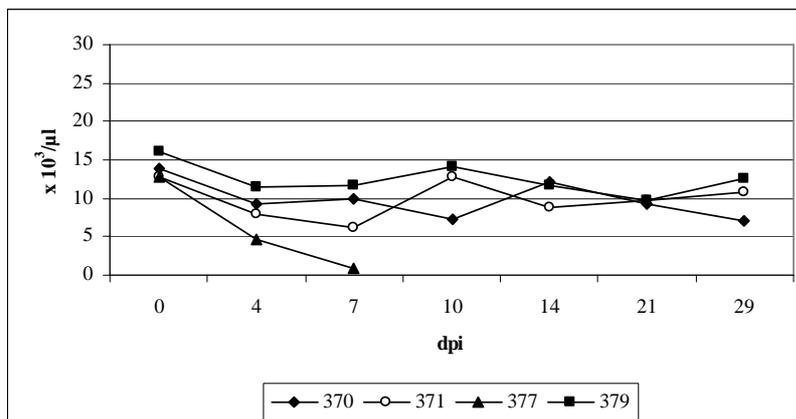
Abb. 38 Rektaltemperaturen, Gruppe 5, Infektionskontrollen (Wildschweine)



4.4.2.2.2. Leukozytenwerte

In den Abb. 39-43 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Leukozytenanzahl pi zusammengefasst. Bei Betrachtung der Werte für die Gruppe 3 (Abb. 39) fällt auf, dass es beim Tier Nr. 377 zu einem starken Abfall der Leukozyten von ausgangs $12,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut auf $0,975 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut am Tag 7 pi. kam. Die Leukopenie korreliert bei diesem Tier mit der im Kapitel 4.4.2.2.1. bereits beschriebenen Klinik.

Abb. 39 Leukozytenwerte, Gruppe 3 (Wildschweine), „C“-Virus



Weiterhin fielen die Leukozytenzahlen der Tiere 371 (4 und 7 dpi) und 370 (10 dpi und 29 dpi) kurzzeitig in den leukopenischen Bereich, wobei sie danach schnell wieder Normalniveau erreichten.

Die Untersuchungsergebnisse der mit der Chimäre immunisierten Tiere sind in den Abb. 40 und 41 zusammengefasst.

Abb. 40 Leukozytenwerte, Gruppe 1 (Wildschweine), CP7_E2alf

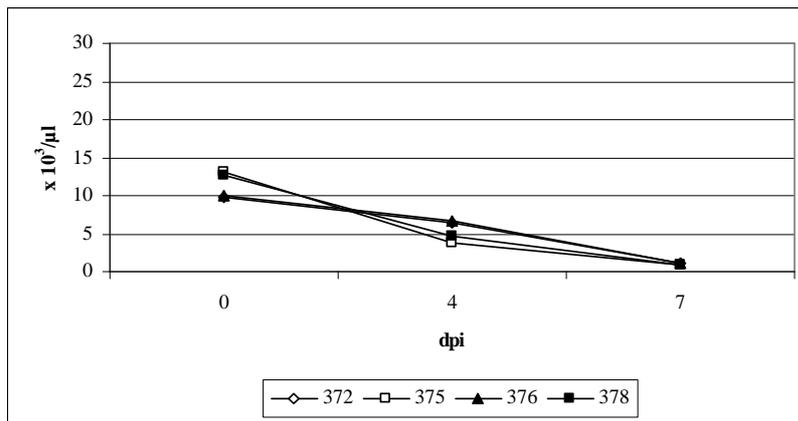
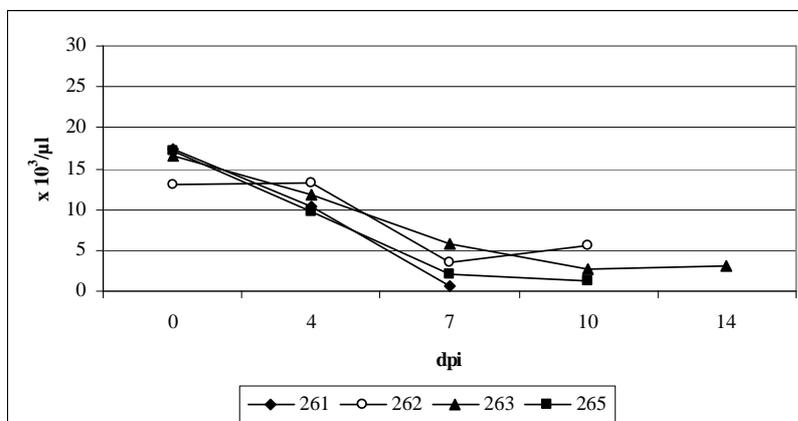


Abb. 41 Leukozytenwerte, Gruppe 2 (Hausschweine), CP7_E2alf



Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass es sowohl bei den Haus- als auch bei den Wildschweinen innerhalb weniger Tage zu einem drastischen Abfall der Leukozytenpopulation kam, vermutlich als Ergebnis der Virusvermehrung in den Leukozyten. So war bei allen Wildschweinen am 4. dpi eine ausgeprägte Leukopenie sichtbar (im Mittel $5,425 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut), welche sich bis zum Tag 7 weiter verstärkte (im Mittel $0,985 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Hausschweinen, wo die Leukopenie aber erst ab Tag 7 pi deutlich wurde (im Mittel $3,02 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut) und bis zum Tode Bestand hatte. Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Infektionskontrollen (Abb. 42 und 43).

Abb. 42 Leukozytenwerte, Gruppe 4, Infektionskontrollen (Hausschweine)

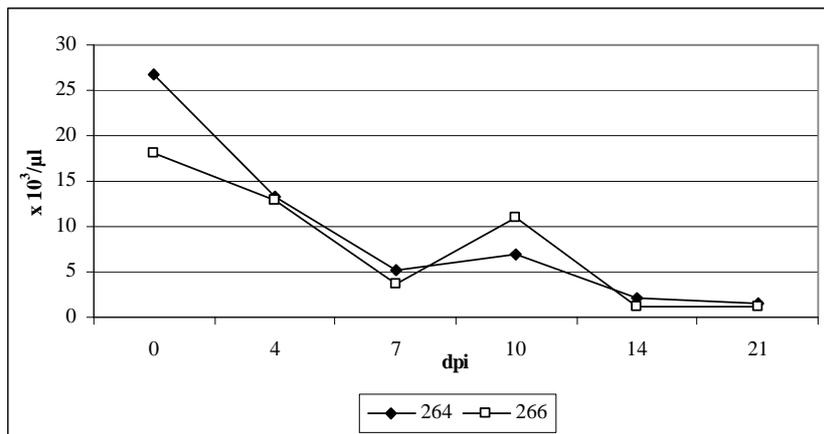
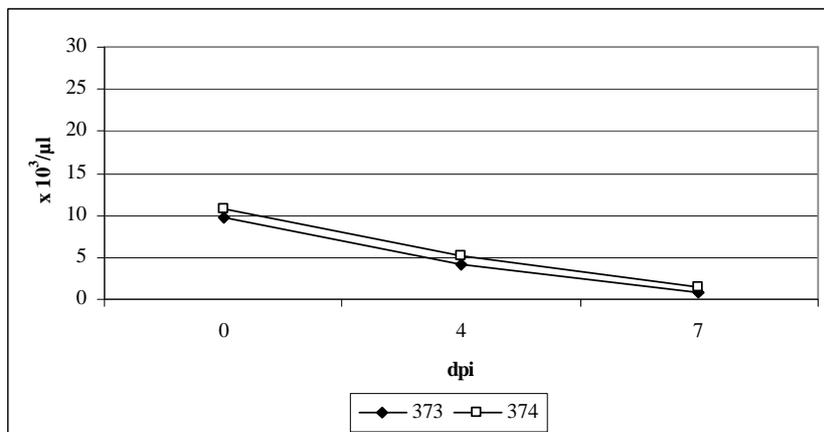


Abb. 43 Leukozytenwerte, Gruppe 5, Infektionskontrollen (Wildschweine)



Ab 4. (Wildschweine) bzw. 7. dpi (Hausschweine) wurde eine drastische Verringerung der Leukozytenpopulation gefunden, die 7 dpi (Wildschweine) mit durchschnittlich $1,1535 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut und 21 dpi (Hausschweine) mit $1,29 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut ihr Minimum erreichte.

4.4.2.2.3. Virologische Befunde

Eine VI aus pv entnommenen VB-Proben gelang auf ZK an allen Blutungstagen bei beiden Impfstämmen nicht, so dass eine Vakzinevirusausscheidung nicht zu erwarten ist.

Die Resultate der virologischen Untersuchung pi sind im Detail in den Tab. 9 bis 11 zusammengefasst. Sie korrelierten bei der „C“-Virus Immunisierungsgruppe sehr stark mit den in den vorangehenden Kapiteln (4.4.2.2.1. und 4.4.2.2.2.) beschriebenen Ergebnissen.

Tab. 9 VI aus BC und RT-PCR Vollblut

<i>Gruppe</i>	<i>0dpi</i>	<i>4dpi</i>	<i>7dpi</i>	<i>10dpi</i>	<i>14dpi</i>	<i>15dpi</i>	<i>21dpi</i>	<i>29dpi</i>
<i>1</i>	0/4	4/4	4/4	†				
<i>2</i>	0/4	4/4	4/4	3/3	1/1*	†		
<i>3</i>	0/4	1/4	1/4	0/3	0/3		0/3	0/3
<i>4</i>	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	†	
<i>5</i>	0/2	2/2	2/2	†				

*nested RT-PCR

Tab. 10 VI und RT-PCR aus Tupferproben

<i>Gruppe</i>	<i>Nasentupfer</i>		<i>Augentupfer</i>		<i>Speicheltupfer</i>		<i>Kottupfer</i>	
	<i>VI</i>	<i>PCR</i>	<i>VI</i>	<i>PCR</i>	<i>VI</i>	<i>PCR</i>	<i>VI</i>	<i>PCR</i>
<i>1</i>	2/4	4/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4
<i>2</i>	3/4	4/4	3/4	4/4	0/4	4/4	1/4	3/4
<i>3</i>	1/4	1/4	0/4	1/4	0/4	0/4	1/4	1/4
<i>4</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2*	1/2	2/2
<i>5</i>	2/2	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2

*nested RT-PCR 7 dpi positiv

In der „C“-Virus-Gruppe gelang es nicht, KSPV bzw. KSPV-Genom aus BC, Tupferproben und Organen zu reisolieren, während ein Tier (Wildschwein Nr. 377) am 4. und 7. dpi virämisch war und in NT sowie in KT Virus, in AuT jedoch nur KSPV-Genom nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis in SpT und KM gelang bei diesem Tier nicht, woraus zu schließen ist, dass der Erreger hauptsächlich über Nasen- und Augensekret sowie über den Kot ausgeschieden wurde.

CP7-E2alf immunisierte Wild- und Hausschweine zeigten eine Virämie ab dem 4. dpi. Zu diesem Zeitpunkt war es bereits möglich, mittels nRT-PCR KSPV-Genom in Tupferproben nachzuweisen.

Ab dem 7. dpi gelang der Virusnachweis bei einigen Tieren aus NT (OM 372, 378, 262, 265), AuT (OM 262, 263, 265) und KT (OM 378). Der KSPV-Nachweis aus Organanreibungen war nicht bei jedem Tier und aus jedem untersuchten Organ (Tab. 11) möglich.

Tab. 11 VI und RT-PCR aus Organanreibungen

<i>Gruppe</i>	<i>Tonsille</i>		<i>Milz</i>		<i>Niere</i>		<i>MLK</i>		<i>DLK</i>		<i>Lunge</i>		<i>KM</i>
	<i>VAZ</i>	<i>PCR</i>	<i>VAZ</i>	<i>PCR</i>	<i>VAZ</i>	<i>PCR</i>	<i>VAZ</i>	<i>PCR</i>	<i>VAZ</i>	<i>PCR</i>	<i>VAZ</i>	<i>PCR</i>	
1	4/4		3/4		4/4		4/4		4/4		4/4		4/4
2	4/4		1/4	3/3 ¹	1/4	1/1 ²	3/4		3/4	1/1 ³	2/4		4/4
3	1/4		1/4		1/4		1/4		1/4		1/4		0/4
4	2/2		2/2		1/2		2/2		2/2		2/2		2/2
5	2/2		2/2		2/2		2/2		2/2		2/2		2/2

¹ OM 261, 262, 263

² OM 262

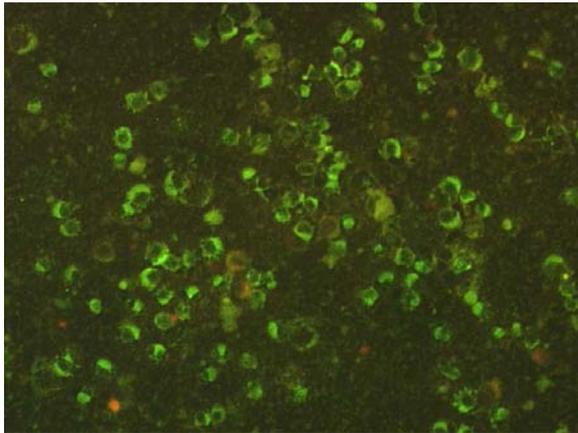
³ OM 265

Lediglich in der Tonsille und bei der Färbung von KM-Ausstrichen konnte das Virus regelmäßig gefunden werden. Ursächlich spielen hierfür sicherlich die im nächsten Kapitel (4.4.2.2.4.) noch näher zu beschreibenden, KSPV-Ak eine Rolle, die zur Neutralisation des Virus und damit zu negativen Ergebnissen führten. So konnte KSPV bei folgenden Tieren nicht isoliert werden: Gruppe 1: OM 376 (Milz), Gruppe 2: OM 261 (Milz, Lunge, MLK), 262 (Milz, Niere), 263 (Milz, Niere, Lunge), 265 (Niere, DLK), in einigen Organen jedoch Virus-Genom mittels RT-PCR (Tab. 11). Die restlichen negativen Proben in der VI wurden nicht in der RT-PCR untersucht, da der mit anderer Fragestellung im pathologischen Labor parallel dazu durchgeführte IIFT bei diesen Schweinen ebenfalls negativ war.

Wie aus den Tab. 9 bis 11 ersichtlich wird, waren alle vier Kontrollen pi virämisch und schieden das hoch infektiöse Challengevirus über Se- und Exkrete aus. Die VI aus Organanreibungen war bei den Wildschweinen in allen untersuchten Organen positiv, während bei dem Hausschwein Nr. 264 der KSPV-Nachweis aus der Niere nicht gelang. Grund ist vermutlich auch hier der hohe Ak-Titer von 1:160 zu Versuchsende (42 dpv). Bei allen positiv getesteten BC-Proben gelang ebenfalls der Genomnachweis mittels RT-PCR (Tab. 9).

Die Auswertung der KM-Ausstriche mit Hilfe des IIFT erbrachte bei den mit Markervakzine geimpften und infizierten Tieren sowie bei den Infektionskontrollen deutlich positive Resultate (wie in Abb. 44 dokumentiert), während bei mit „C“-Virus immunisierten Schweinen das KM negativ zu bewerten war.

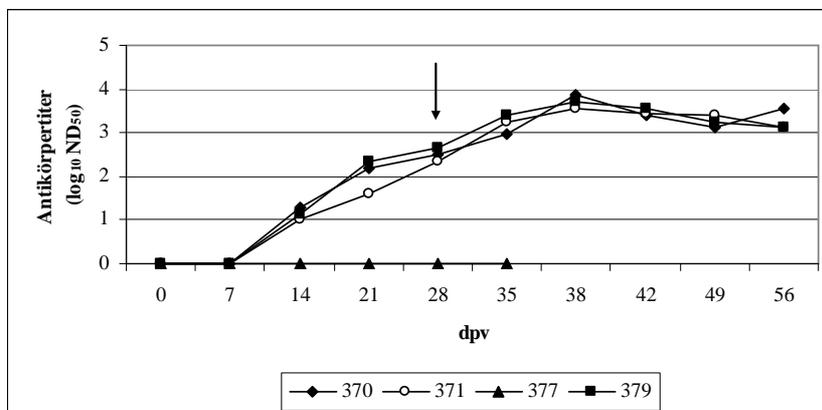
Abb. 44 IIFT KM-Ausstrich



4.4.2.2.4. Serologische Befunde

Die Untersuchung der Serumproben, die von den mit dem „C“-Stamm immunisierten Wildschweinen stammten, ergab, dass bereits 14 dpv (OM 370, 371, 379) erste virusneutralisierende Ak festzustellen waren (Abb. 45).

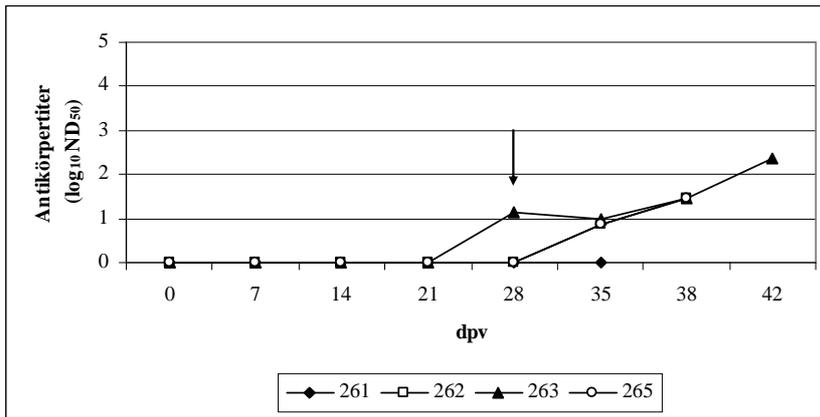
Abb. 45 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 3 (Wildschweine), „C“-Virus



Diese Tiere erreichten am Tag der Belastungsinfektion einen mittleren Ak-Titer von 1:334. Das Tier Nr. 377, welches im Voraus bereits durch klinische Symptome und eine Leukopenie auffiel, hatte nicht auf die Impfung „reagiert“ und blieb Ak-frei bis zum Sektionstag, während die übrigen drei Tiere zu diesem Zeitpunkt einen durchschnittlichen Ak-Titer von 1:1.459 aufwiesen.

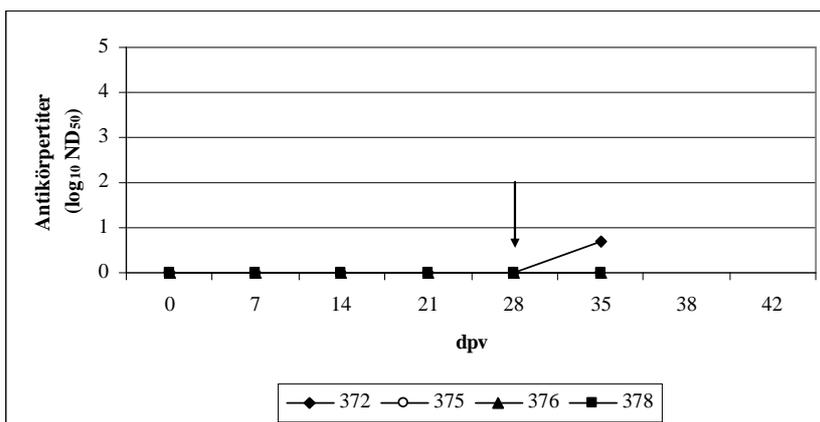
Die mit CP7_E2alf geimpften Tiere hatten bis auf ein Hauschwein (OM 263) am Tag der Infektion noch keine neutralisierenden Ak gebildet (Abb. 46).

Abb. 46 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 2 (Hausschweine), CP7_E2alf



Erst am 7. dpi (35 dpv) wurde bei 3 Tieren aus Gruppe 2 (OM 262, 263, 265) eine beginnende Serokonversion festgestellt, wobei die Titer im Bereich von 1:7 bzw. 1:10 lagen. Durch die fehlenden Ak zum Zeitpunkt der Challenge waren die Tiere nicht vor KSP geschützt und verendeten schließlich 9 (OM 261), 12 (OM 265), 14 (OM 262) bzw. 15 dpi (OM 263). Das Tier mit der OM 261 bildete während des gesamten Versuchs keine neutralisierenden Ak, während die Schweine 262, 263 und 265 am 10. dpi (38 dpv) Ak-Titer von 1:28 hatten. Am Tag der Sektion wies die OM 263 mit 1:227 den höchsten neutralisierenden Ak-Titer in dieser Gruppe auf.

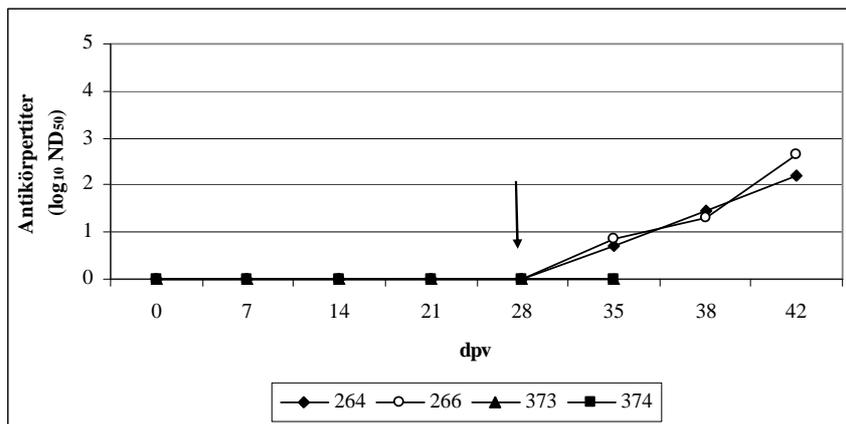
Abb. 47 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 1 (Wildschweine), CP7_E2alf



Bei den Wildschweinen aus Gruppe 1 wurde bei einem Tier (OM 372) am 7. dpi (35 dpv) eine beginnende Immunreaktion festgestellt (Titer 1:5). Alle anderen CP7_E2alf vakzinierten Versuchstiere blieben bis zu ihrem Tod seronegativ (Abb. 47), da sie bereits relativ rasch nach der Infektion erkrankten und schließlich verendeten.

Ein statistisch signifikanter Unterschied im Ak-Titer konnte ab dem 28 dpv zwischen Gruppe 3 und Gruppe 1 nachgewiesen werden, sowie zwischen Gruppe 3 und Gruppe 2 ($p < 0,05$). Dieser Unterschied zugunsten der „C“-Virusgruppe wurde letztlich auch im ermittelten Schutz der Tiere deutlich.

Abb. 48 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 4 und 5, Infektionskontrollen



Die Hausschweinekontrollen begannen 7 dpi (35 dpv) ebenfalls mit der Ak-Bildung (Abb. 48) und erreichten am Tag ihrer Sektion Titer von 1:160 (OM 264) und 1:453 (OM 266). Der moderate Krankheitsverlauf bei diesen Tieren in Verbindung mit der Ausbildung neutralisierender Ak erklärt ihre lange Überlebenszeit. Die Tiere wurden 15 dpi (43 dpv) im moribunden Zustand getötet. Demgegenüber blieben die Wildschweinekontrollen (OM 373, 374), die bereits 9 dpi verendeten, bis zum Schluss seronegativ.

Die Untersuchung der Serumproben der mit CP7_E2alf geimpften Schweine verlief im BOMMELI-ELISA bis zum 7. dpi negativ. Am Tag der Sektion war das Hausschweine Nr. 261 noch negativ (0%), während die Tiere 262 (VNT-Titer 1:28), 263 (VNT-Titer 1:227) und 265 (VNT-Titer 1:28) im ELISA mit 73%, 93% und 86% positiv reagierten. Der CEDI-E^{ms}-ELISA detektierte bis zum Challengezeitpunkt alle vakzinierten Schweine als negativ (Hemmung zwischen 0 und 32%). Seine Eignung als DIVA-Diagnostikum kann jedoch in diesem Versuchsansatz nicht bewertet werden, da die Tiere bis zur Challenge keine Ak bildeten und bereits kurz nach Infektion verendeten.

4.4.2.2.5. Pathologisch-anatomische Befunde

Bei der Sektion der klinisch gesunden Tiere aus Gruppe 3 („C“-Gruppe) wurden, abgesehen von einer ggr. Bronchopneumonie des Spitzenlappens bei zwei Wildschweinen (370, 371), welche vermutlich auf die klimatischen Bedingungen im Isolierstallgebäude zurückzuführen ist, keine weiteren pathologisch-anatomischen Befunde festgestellt.

Demgegenüber zeigten sich bei der Obduktion der übrigen Versuchstiere (Gruppe 1, 2, 4, 5), pathomorphologische Veränderungen, die für KSP sprachen, wie die pathognomonischen Milzrandinfarkte (Abb. 49), Tonsillarnektosen, Epiglottisblutungen (Abb. 50) (Tiere Nr. 264, 266, 262, 263), Petechien auf der äußeren Haut und den Nieren (Abb. 51) sowie mgr.-hgr. geschwollene und blutig imbibierte MLK (Abb. 52) und DLK.

Abb. 49



Abb. 50



Abb. 51

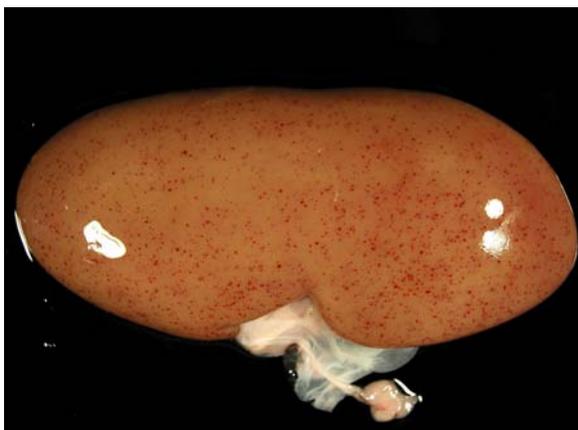


Abb. 52



Ein Großteil der erkrankten Tiere wies außerdem eine akute diffuse katarrhalische Enteritis und eine akute Gastritis auf. Häufig fanden sich an der Ileozäkalklappe des Darms Nekroseherde.

Petechien in der Harnblase waren seltener vorhanden (OM 373, 262, 264, 266, 263, 265). Die Tiere 373, 374, 261, 262 hatten weiterhin Petechien am Herzen (Muskel- und Serosablutungen), während bei zwei Schweinen (OM 261, 376) eine Perikarditis diagnostiziert wurde. Das am 7. dpi post Probenahme verendete Wildschwein (OM 378) hatte einen hgr. Hämothorax sowie eine akute fibrinöse Pleuritis. Die Brusteingangslymphknoten wiesen eine frische Blutresorption sowie ein perijuguläres Hämatom auf, letzteres vermutlich durch die Blutentnahme hervorgerufen. Des Weiteren wurden eine Konjunktivitis sowie gerötete Tonsillen, linksseitig vergrößerte MLK, eine Bronchopneumonie und eine gestaute Leber festgestellt. Alle bei der Obduktion entnommenen Organe (plus Leber) dieses Tieres wurden bakteriologisch untersucht. Der Befund wies auf eine bakterielle Mischinfektion hin, bestehend aus *Escherichia coli*, Streptokokken und Staphylokokken. Solche bakteriellen Sekundärkontaminationen sind im Zusammenhang mit einer systemisch verlaufenden Virusinfektion nicht selten.

Eine eventuell vorhandene Pasteurelleninfektion, die zur diagnostizierten Bronchopneumonie geführt haben könnte, wurde nicht bestätigt.

Im Ergebnis des Tierversuchs ist festzuhalten, dass alle mit „C“-Vakzine erfolgreich immunisierten Tiere hohe neutralisierende Ak-Titer aufwiesen, geschützt waren und keine Virusausscheidung zeigten. Im Gegensatz dazu erkrankten die mit der Chimäre CP7_E2alf vakzinierten Haus- und Wildschweine (Gruppen 1 und 2) nach Infektion und schieden auch das Challengevirus über Körperflüssigkeiten aus. Folglich ist dieser lyophilisierte Markervakzinekandidat in der vorliegenden Konfektionierung und im Zusammenhang mit einem Virusgehalt von $10^{5,6}$ KID₅₀/ml nicht für die o.I. gegen KSP bei Wildschweinen, respektive auch bei Hausschweinen, geeignet. Dieses Fazit ist nicht ganz erklärbar, da in einem anderen Experiment von König et al. (2006) Wildschweine erfolgreich oral mit flüssigem CP7_E2alf-Virus immunisiert wurden und komplett geschützt waren. Auch in einem, im letzten Teil dieser Arbeit beschriebenen, eigenen Tierversuch erkrankte nach i.m. Vakzination (2 ml, $10^{6,5}$ KID₅₀/ml CP7_E2alf) und Challenge mit KSPV „Koslov“ (28 dpv, $10^{5,75}$ KID₅₀/ml) keines der 5 Läuferschweine.

Der Grund für die uneffektive Immunisierung und damit das Fehlen protektiver neutralisierender Ak bei den CP7_E2alf-Lyophilisat immunisierten Schweinen könnte an

einer zu geringen Vakzinationsdosis liegen (Unterschreitung der minimal immunisierenden Dosis, MID), zumal mit höherem Virusgehalt pro Impfdosis Flüssigvirus von König et al. (2006) Wildschweine erfolgreich immunisiert wurden.

Es ist unwahrscheinlich, dass das negative Tierversuchsergebnis an der Lyophilisation des Markervakzinekandidaten liegt, da der Virustiter durch die Lyophilisation nur leicht abfiel (von $10^{6,5}$ KID₅₀/ml vor Lyophilisation auf 10^6 KID₅₀/ml nach Lyophilisation).

Auf Grund der negativen Versuchsergebnisse mit dem Virus CP7_E2alf, wurde im Institut für Molekularbiologie (IMB) des FLI ein Markerkandidat der zweiten Generation konstruiert (CP7_E1E2alf), der auf der Chimäre CP7_E2alf basiert und zusätzlich zum E2-Gen des KSPV „Alfort 187“ noch dessen E1-Sequenz enthält (unter Deletion des E1-Gens von BVDV). Das E1-Protein ist ein weiteres wichtiges Hüllprotein mit Funktionen für die zelluläre Immunität und Virusvermehrung und es könnte daher zusammen mit dem homologen E2-Protein ein funktionierendes Dimer bilden, welches im Ergebnis eine optimalere Schutzantwort induziert.

Diesen wissenschaftlichen Fragestellungen wurde in einem letzten Experiment nachgegangen, wobei zuerst parenteral immunisiert wurde. Späterhin ist auch die o.I. mit dieser Chimäre vorgesehen.

4.4.3. Untersuchungen zur Effektivität des chimären Pestivirus CP7_E1E2alf im Vergleich mit CP7_E2alf und der „C“-Stamm-Vakzine nach parenteraler Applikation

4.4.3.1. Versuchsaufbau

4.4.3.1.1. Ziel des Versuchs

Mit Hilfe dieses Tierversuchs sollte überprüft werden, inwieweit der neu konstruierte Markervakzinekandidat CP7_E1E2alf in der Lage ist, Tiere nach parenteraler Immunisierung vor einer KSPV-Infektion zu schützen. Weiterhin sollte die Frage der Impfvirusausscheidung beantwortet werden, indem einen Tag nach Vakzination Kontaktkontrollen (KK, OM 16, 17, 20) zu den Impfungen eingestellt wurden. Als Positivkontrolle wurde eine mit „C“-Virus geimpfte Schweinegruppe mitgeführt.

4.4.3.1.2. Tiermaterial

Für das Experiment kamen 20 Hausschweine zum Einsatz. Herkunft und Rasse der Tiere sind in Kapitel 4.4.1.1.1.2. beschrieben.

4.4.3.1.3. Vakzination

Die Schweine wurden in 4 Gruppen eingeteilt. Die Tiere mit den OM 29-33 (Gruppe 1) erhielten 2 ml der CP7_E1E2alf-Vakzine i.m. (Nackermuskulatur) injiziert, während die Schweine mit den OM 34-38, (Gruppe 2) CP7_E2alf i.m. appliziert bekamen. Die Schweine 24-28, (Gruppe 3) wurden i.m. mit dem „C“-Stamm geimpft, während die übrigen zwei Tiere (OM 22, 23) vorerst unbehandelt blieben und später als Infektionskontrollen dienten. Nach Rücktitration der Impfviren wurden folgende Titer erzielt:

CP7_E1E2alf	$10^{8,125}$ KID ₅₀ /ml
CP7_E2alf	$10^{6,5}$ KID ₅₀ /ml
„C“-Stamm	$10^{5,625}$ KID ₅₀ /ml.

4.4.3.1.4. Challenge

Die Belastungsinfektion erfolgte 28 dpv oronasal mit dem KSPV „Koslov“ ($10^{6,0}$ KID₅₀/ml) wie in Kapitel 4.4.2.1.4. beschrieben.

Den Schweinen wurde diese Challengedosis in die Nasenöffnung (1 ml) und ins Maul (1 ml) verabreicht, wobei die Flüssigkeit langsam appliziert wurde. Vor Infektion erfolgte die Ausstellung der KK (OM 16, 17, und 20) sowie deren Sektion.

4.4.3.1.5. Probenahme

Die Beprobungstage waren mit den in Abschnitt 4.4.2.1.5. aufgeführten Zeitpunkten identisch.

Vollblut (EDTA) und Serum (für VNT, ELISA) wurde pv an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 gewonnen, während ab dem 28. dpv (0. dpi) zusätzlich Tupferabstriche (NT) untersucht wurden (4, 7, 10 und 21 dpi). Die Analyse der Proben erfolgte, wie in den vorherigen Experimenten ausgeführt, bzgl. der virologischen Untersuchungen mittels VI und RT-PCR/Real-Time PCR.

4.4.3.2. Ergebnisse und Diskussion

4.4.3.2.1. Klinisches Bild pv und pi

Auf die Vakzination reagierten die Schweine erwartungsgemäß ohne klinische Symptome. Auch trat weder bei ihnen noch bei den KK Fieber auf, wie aus den nachfolgenden Temperaturkurven ersichtlich ist (Abb. 53 und 54).

Abb.53 Rektaltemperaturen, Gruppe 1 (CP7_E1E2alf), pv

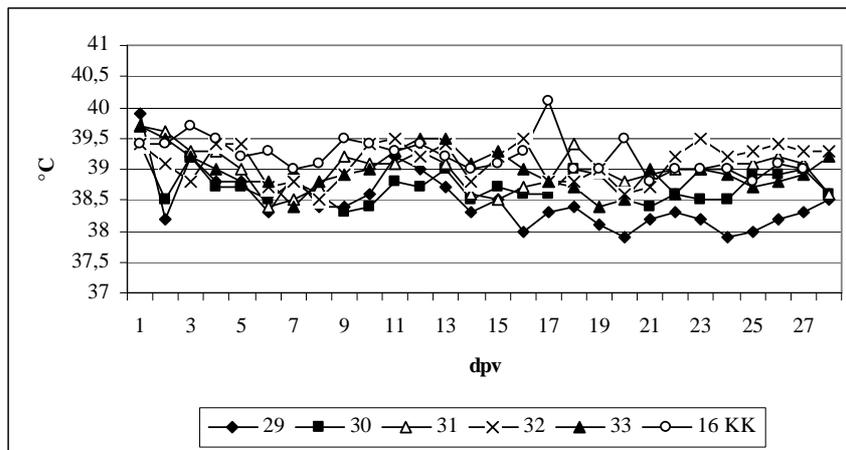
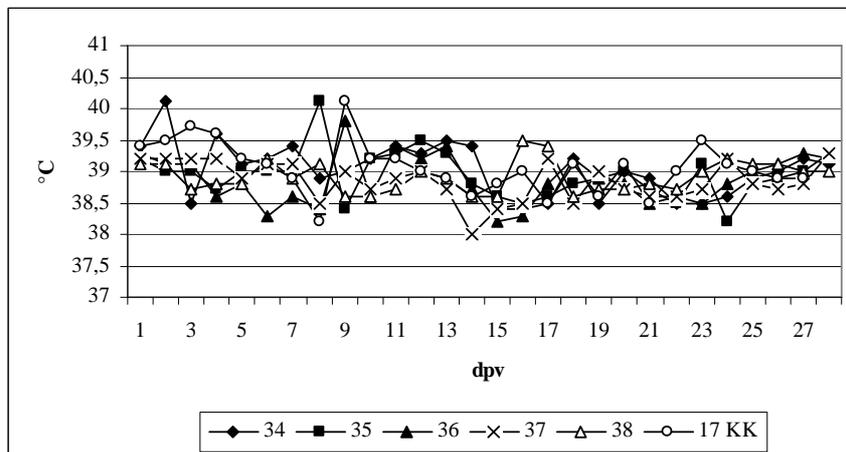


Abb. 54 Rektaltemperaturen, Gruppe 2 (CP7_E2alf), pv

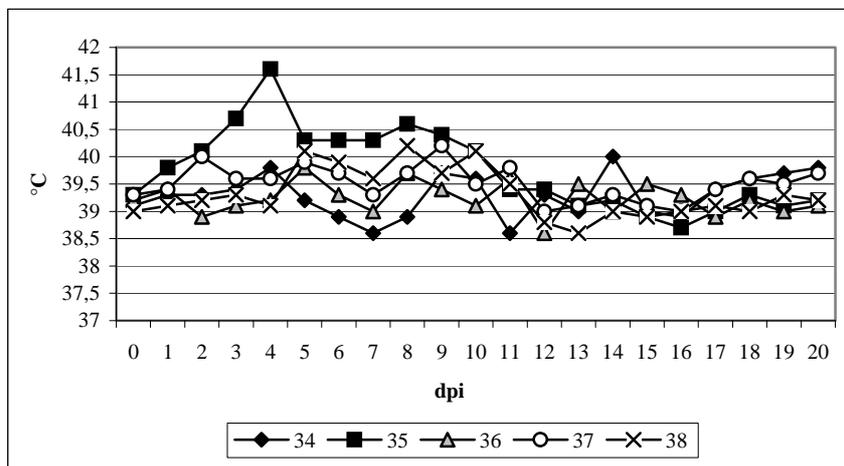


Vereinzelt wurde eine kurzzeitige Temperaturreaktion festgestellt. In Gruppe 1 (Abb. 53) zeigte das Tier Nr. 16 (KK) am 17. dpv eine ggr. einmalige Temperaturerhöhung auf 40,1°C. Bei einzelnen Schweinen in Gruppe 2 (OM 34, 35 und 17) waren Temperaturen über 40°C, aber unter 40,5°C, am 2., 8. und 9. dpv zu beobachten (Abb. 54). In allen Fällen handelte es sich nur um einen kurzzeitigen Anstieg der Rektaltemperatur, der wahrscheinlich in

Zusammenhang mit der Beunruhigung der Tiere beim Messen der Temperatur zu sehen ist. Bei der Immunisierung mit „C“-Virus war keine Temperaturerhöhung feststellbar (n.d.). Auch konnten an der Injektionsstelle aller Tiere keine morphologisch wahrnehmbaren Veränderungen gesehen werden.

Die klinische Untersuchung pi ergab, dass alle vakzinierten Tiere, außer Schwein Nr. 35 aus Gruppe 2, keine Beeinflussung des Allgemeinbefindens zeigten. Dieses Tier entwickelte über einen längeren Zeitraum Fieber, beginnend am 3. dpi, wobei erst am 9. dpi wieder die Normaltemperatur erreicht wurde (Abb. 55). Das Fieber war verbunden mit Inappetenz sowie ggr. Apathie und ist als Reaktion auf die Challenge mit „Koslov“-Virus zu sehen.

Abb. 55 Rektaltemperaturen, Gruppe 2 (CP7_E2alf), pi



Die Tiere der Gruppen 1 und 3 blieben fieberfrei (Abb. 56 und 57).

Abb. 56 Rektaltemperaturen, Gruppe 1 (CP7_E1E2alf), pi

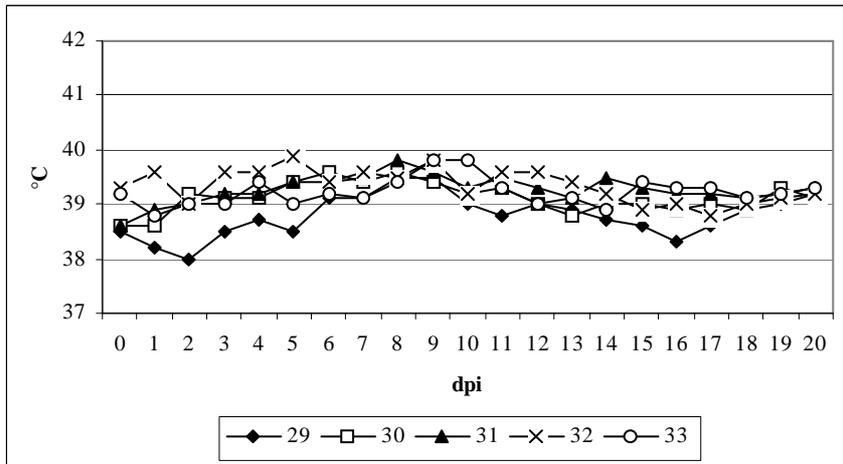
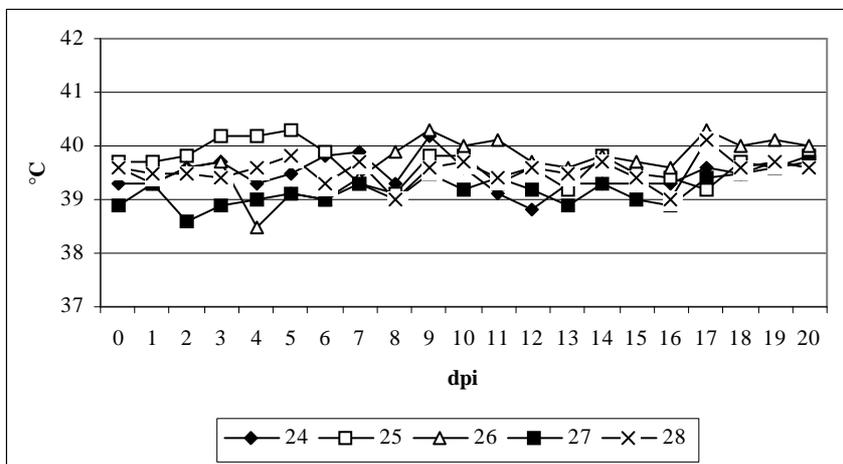


Abb. 57 Rektaltemperaturen, Gruppe 3 („C“-Virus), pi



Eine 3tägige ggr. Erhöhung der Körpertemperatur (Tage 3-5 pi, < 40,5°C) zeigte Tier Nr. 25 aus Gruppe 3. Inwieweit es sich hierbei um eine Reaktion auf die Infektion handelt, kann nicht exakt eingeschätzt werden. Alle übrigen Laborbefunde (siehe weitere Ergebnisse) sprechen jedoch dagegen.

Beide Infektionskontrollen entwickelten als erste Krankheitssymptome 3-4 dpi Apathie und Anorexie. Im Laufe der Infektion zeigten sich weiterhin Konjunktivitis, Durchfall, Erbrechen sowie zentralnervösen Störungen (Ataxie, Tremor) und später auch Festliegen, woraufhin sie aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet wurden.

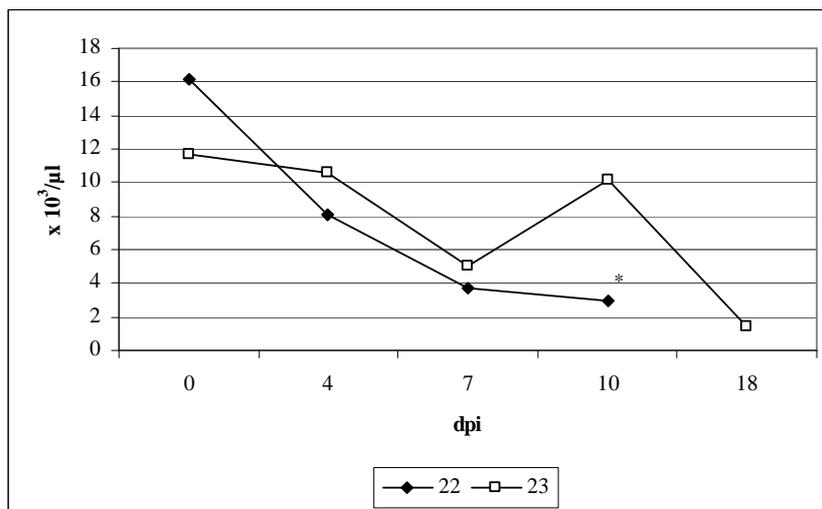
Bei Betrachtung der Temperaturkurven der Infektionskontrollen (n.d.) fiel auf, dass das Tier Nr. 23 bereits 3 dpi hohes Fieber (41,3°C) hatte, welches bis zum Tag der Sektion (Euthanasie im moribunden Zustand, 18 dpi) auf 38,6°C sank.

Das zweite Kontrollschwein (OM 22) zeigte ab dem 4. pi Fieber und musste 9 dpi im moribunden Zustand euthanasiert werden.

4.4.3.2.2. Leukozytenwerte

Die Auswertung der EDTA-Blutproben mit Hilfe des Blutzählgerätes CELL DYN[®] 3700 ergab keine pathologischen Auffälligkeiten bei den immunisierten Schweinen (n.d.). Allein bei den Kontrolltieren kam es zu einem signifikanten Abfall der Leukozyten von ausgangs (0 dpi) $16,1 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut (OM 22) bzw. $11,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut bei dem Tier Nr. 23 auf einen Wert von $2,93 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut (OM 22) bzw. $1,45 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut (OM 23) am Tag der Sektion, was auf eine massive Vermehrung und anschließende Zerstörung der Leukozyten durch das KSP-Virus „Koslov“ schließen lässt. In Diagramm 58 sind die Werte der Blutanalyse der Infektionskontrollen grafisch dargestellt.

Abb. 58 Leukozytenwerte, Gruppe 4 (Infektionskontrollen)



* VB vom 9. dpi

4.4.3.2.3. Virologische Befunde

Nach Vakzination der Schweine (pv) war ein virologischer Nachweis von Impfvirus mittels VI und Real-Time PCR („C“-Virus, CP7_E2alf und CP7_E1E2alf) aus VB- bzw. Serumproben 7, 14, 21 sowie 28 dpv (0 dpi) nicht möglich.

Nach Infektion verlief die VI aus NT, BC und Organanreicherung sowie der Ag-Nachweis in den KM-Ausstrichen nur bei den Infektionskontrollen positiv, welche pi auch klassisch an KSP erkrankten. Eine Zusammenstellung der Befunde zeigen die Tab. 12 und 13.

Tab. 12 VI aus BC und Tupferproben (NT)

<i>Gruppe</i>	<i>0dpi</i>	<i>4dpi</i>	<i>7dpi</i>	<i>10dpi</i>	<i>21dpi</i>
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4	0/2	2/2	2/2	2/2** ¹	1/1* ² x

* OM 22 BC vom 9. dpi

*¹ OM 22 NT vom 9. dpi

*² OM 23 BC vom 18. dpi

x OM 23 kein NT vom 18. dpi

Tab. 13 VI aus Organanreicherungen und KM-Ausstrichen

<i>Gruppe</i>	<i>Tonsille</i>	<i>Milz</i>	<i>Niere</i>	<i>MLK</i>	<i>DLK</i>	<i>Lunge</i>	<i>KM</i>
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

Die Untersuchungsbefunde zeigen weiterhin, dass alle Tiere vor einer tödlichen KSPV-Infektion geschützt waren, letztlich auch das Tier aus Gruppe 3, welches über mehrere Tage pi Fieber hatte. Die Untersuchungen mit den beiden chimären Pestiviren CP7_E2alf und CP7_E1E2alf, parenteral appliziert, zeigen, dass diese im Gegensatz zum oral verabreichten CP7_E2alf-Lyophilisat in der Lage sind, eine Infektion mit KSPV zu verhindern. Damit werden frühere Erfahrungen von Reimann et al. (2004) bestätigt. Dass die Hausschweine nach parenteraler Vakzination geschützt sind, war ohnehin erwartet worden.

Alle Serum- (pv und pi) und NT-Proben wurden zudem einer Untersuchung in der Real-Time PCR unterzogen. Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass kein KSPV-Genom (Vakzinevirus, Challengevirus) im Serum sowie in den NT nachgewiesen werden konnte (keine TC-Werte bzw. TC > 40). Beim Tier mit der OM 38 (CP7_E2alf) wurde am 0. dpi (28 dpv) ein fraglicher Befund ermittelt (n.d.). Vermutlich handelt es sich hierbei um eine

Kontamination im Labor, da dieses Tier zu diesem Zeitpunkt noch keinen Kontakt mit dem hoch virulenten „Koslov“-Virus hatten. In der anschließenden utr-RT-PCR war die Probe dann auch negativ.

Die Real-Time Resultate der Tonsillarproben sind in den Tab. 14a-14c dargestellt.

Tab. 14a-14c Real-Time Ergebnisse Tonsille

Tab. 14a

<i>CP7_E1E2alf</i>					
OM	29	30	31	32	33
TC	33	35	34	26	31

Tab. 14b

<i>CP7_E2alf</i>					
OM	34	35	36	37	38
TC	32	30	27	28	29

Tab. 14c

<i>„C“-Virus</i>					
OM	24	25	26	27	28
TC	37	36	37	0	0

Auffällig ist, dass alle Tonsillen der beiden chimären Pestiviren PCR positiv waren. Die Sequenzierung dieser Proben ergab KSPV-„Koslov“, was beweist, dass 21 dpi das Challengevirusgenom in den Tonsillen noch vorhanden war. Eine Gefahr der Virustransmission sollte jedoch nicht bestehen, da es sich auf Grund der übrigen negativen Laborbefunde um „inaktives, nicht vermehrungsfähiges Virus“ handelt. Bei den „C“-Stamm vakzinierten Schweinen traten bei drei Tieren (OM 24, 25, 26) fragliche Ergebnisse auf, die in der utr-RT-PCR jedoch mit negativem Ergebnis abgeklärt werden konnten.

4.4.3.2.4. Serologische Befunde

Die ersten ggr. neutralisierenden Ak waren im Serum ab dem 7. dpv zu finden. Es handelte sich um je ein Tier aus den Gruppen 2 und 3 („C“-Virus, OM 24, Titer 1:7); (CP7_E2alf, OM 37, Titer 1:5) sowie um die Gruppe 1 (Cp7_E1E2alf), in der alle Schweine niedrige Ak-Titer aufwiesen (1:5-1:7). Die detaillierten Befunde sind in den Abb. 59-61 aufgezeigt.

Vor Versuchsbeginn waren alle Tiere im VNT gegen KSP, BVD1, BVD2 und BDV negativ getestet worden.

Zum Zeitpunkt der Challenge-Infektion hatten die Tiere serokonvertiert und wiesen Ak-Titer auf, die sich zwischen 1:20 (Gruppe 3) bis 1:453 (Gruppe 2) bewegten.

Abb. 59 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 1 (CP7_E1E2alf)

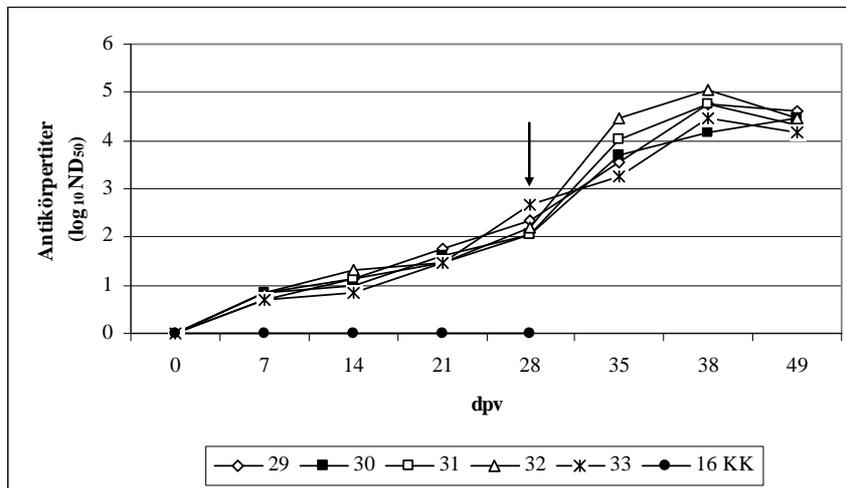


Abb. 60 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 2 (CP7_E2alf)

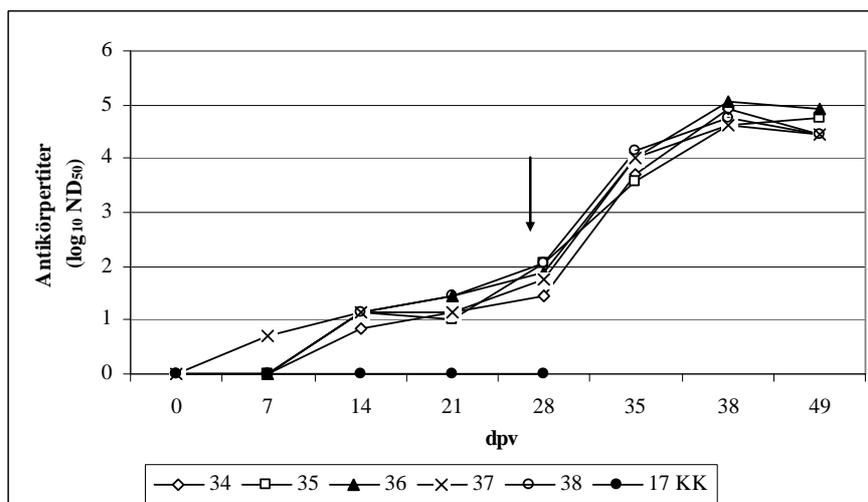
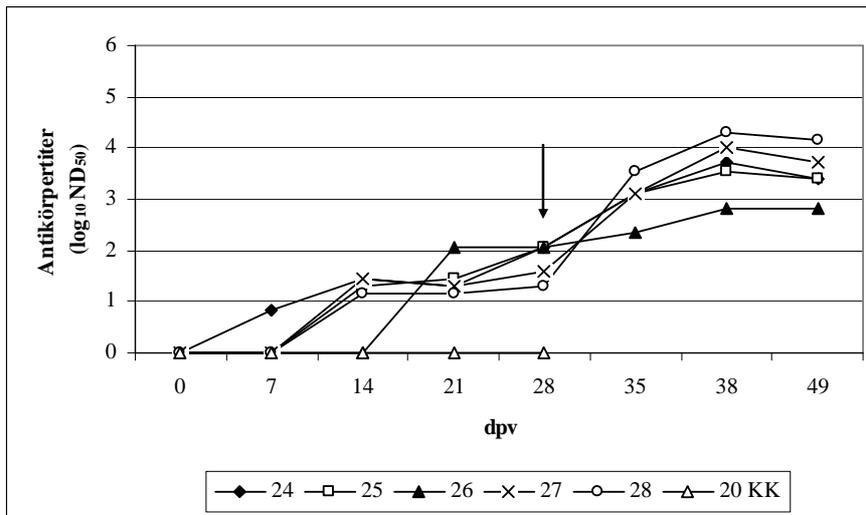


Abb. 61 Entwicklung neutralisierender Ak, Gruppe 3 („C“-Virus)



Die höchsten Ak-Titer erreichten zu diesem Zeitpunkt die mit CP7_E1E2 vakzinieren Tiere (im Mittel 1:213), gefolgt von den mit „C“-Virus immunisierten Schweinen (im Mittel 1:80) und den Tieren der CP7_E2alf-Gruppe (im Mittel 1:78).

Ein statistischer Unterschied im Ak-Niveau konnte 28 dpv zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 zugunsten Gruppe 1 ermittelt werden.

Zum Ende des Versuchs (49 dpv) erreichten die neutralisierenden Ak in Gruppe 2 mittlere Titer von 1:45.434, während Gruppe 1 und 3 mittlere Ak-Werte von 1:26.816 und 1:5.081 erreichten. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die mit den chimären Pestiviren immunisierten Tiere signifikant höhere Titer auf ($p < 0,05$), als die mit dem konventionellen „C“-Virus vakzinieren Schweine. Zwischen den beiden Marker Kandidaten konnten mit Hilfe der biostatistischen Analyse keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$). Die KK (OM 16, 17, 20) blieben erwartungsgemäß bis Tag 28 pv seronegativ.

Zur Validierung der beiden Chimären als Marker Kandidaten, kamen pv und pi E2- und E^{ms}-blocking ELISA's (jeweils CEDI) zur Anwendung. Im E2-ELISA reagierten ab dem 21. dpv alle Tiere in allen 3 Gruppen positiv, wobei die Tiere der OM 27 (Ak-Titer 1:28), 28 (Ak-Titer 1:14), 34 (Ak-Titer 1:7) und 32 (Ak-Titer 1:20) bereits am 14. dpv den Grenzwert von $\geq 40\%$ überschritten (Abb. 62 und 63).

Abb. 62 CEDI-E2-ELISA, Gruppe 1 (CP7_E1E2alf)

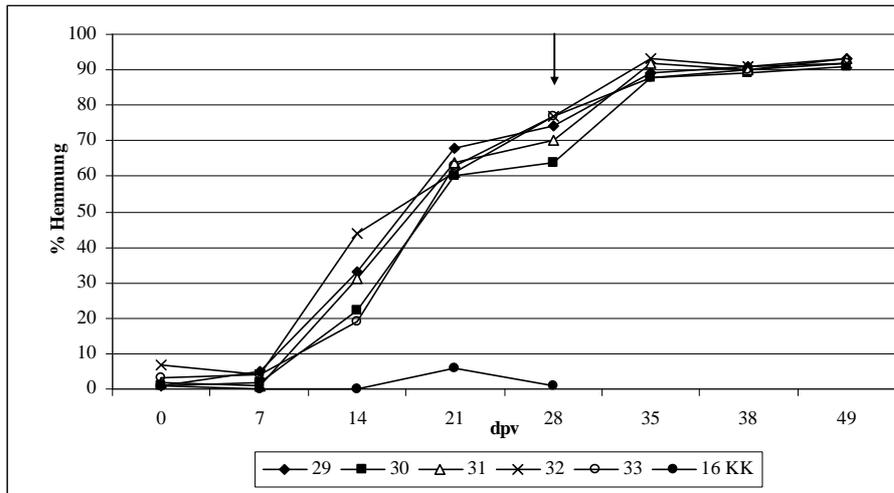
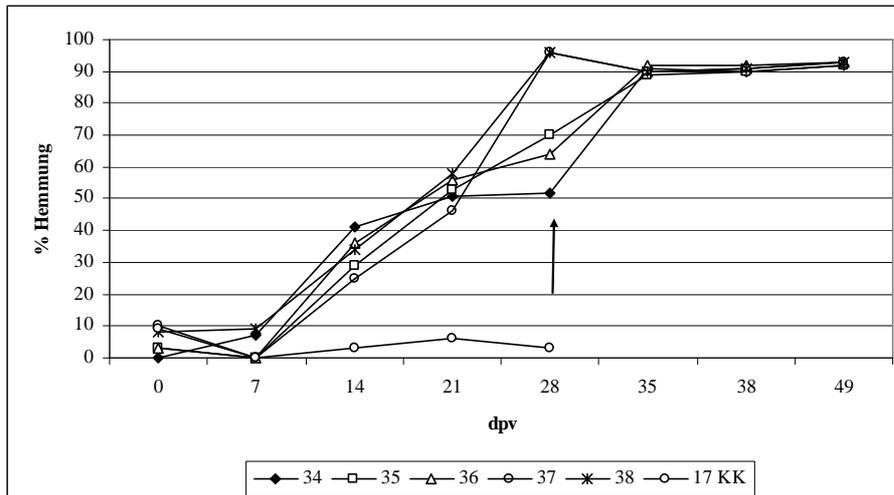


Abb. 63 CEDI-E2-ELISA, Gruppe 2 (CP7_E2alf)



Die Ergebnisse demonstrieren, dass dieser ELISA dementsprechend in der Lage ist, mit CP7_E2alf bzw. CP7_E1E2alf vakzinierter Tiere durch den Nachweis von E2-Ak zu erkennen

Während der E^{ms}-ELISA, als diskriminierender ELISA zur Unterscheidung von infizierten bzw. mit Markervakzinen immunisierten Schweinen vorgesehen, pv alle mit beiden Chimären vakzinieren Tieren als E^{ms} negativ detektiert, war er hingegen nicht im Stande, alle vakzinieren-infizierten Schweine sicher zu erkennen (Abb. 64 und 65).

Abb. 64 CEDI-E^{rns}-ELISA, Gruppe 1 (CP7_E1E2alf)

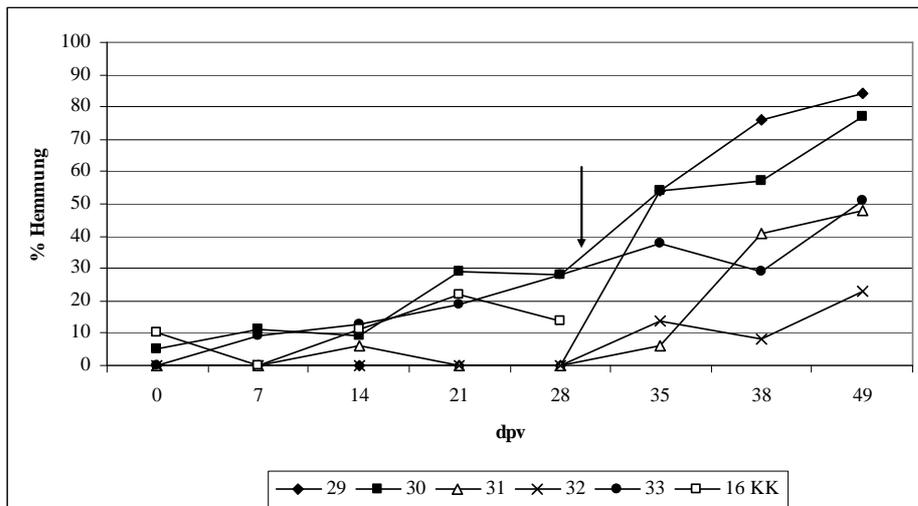
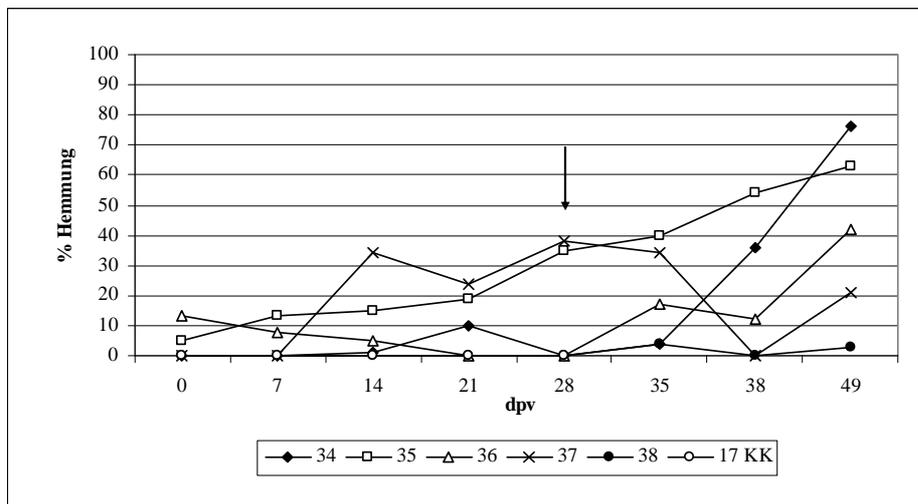


Abb. 65 CEDI-E^{rns}-ELISA, Gruppe 2 (CP7_E2alf)



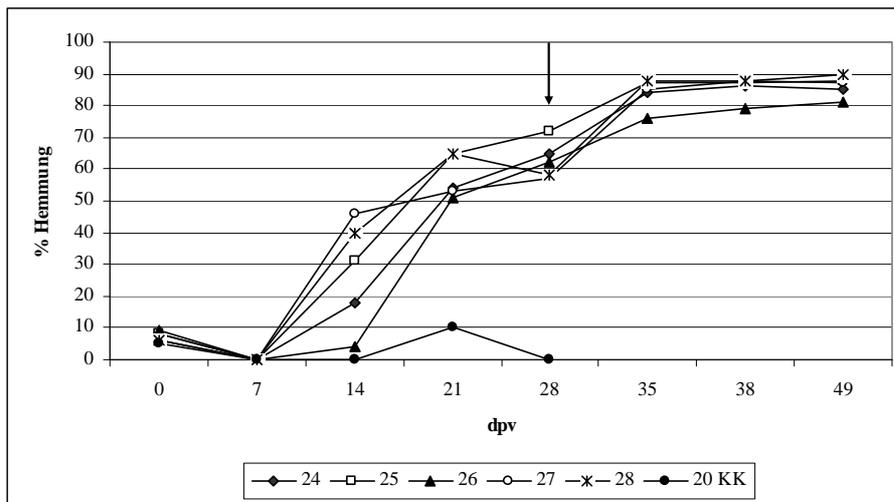
Da die Schweine durch die Challenge-Infektion mit einem kompletten KSPV infiziert worden waren, wäre erwartet worden, dass alle mit den Chimären vakzinierten und dann infizierten Tiere im ELISA als positiv diagnostiziert worden wären ($\geq 50\%$). Weiterhin hätte es durch die Infektion nicht nur zu einer verstärkten Ak-Bildung gegen das SP E2 und das NSP NS2-3 kommen dürfen, sondern nunmehr auch zu Bildung von Ak gegen das E^{rns}-Protein, die im E^{rns}-Ak-ELISA hätten nachzuweisen sein müssen. Von den untersuchten Tieren reagierten hier in Gruppe 1 jedoch nur drei von fünf Tieren positiv.

Die Tiere mit den OM 29 und 30 dieser Gruppe erreichten ab dem 35. dpv den Grenzwert des Tests, während Tier Nr. 33 erst zu Versuchsende (49. dpv) positiv getestet werden konnte (Abb. 64). In Gruppe 2 (CP7_E2alf) detektierte der ELISA nur zwei von fünf Tieren als

positiv (Abb. 65). Es handelte sich um die Schweine 34 und 35, die an den Tagen 38 pv (OM 35) und 49 pv (OM 34) $\geq 50\%$ Hemmung aufwiesen.

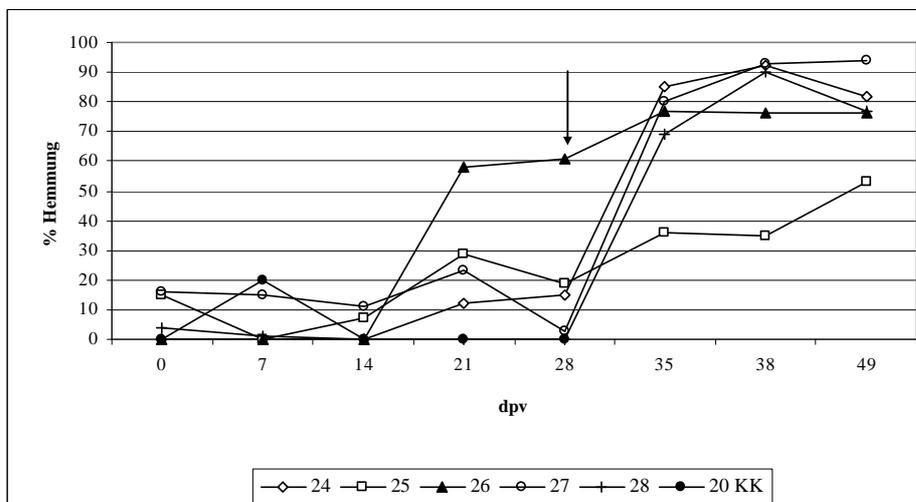
Der CEDI-E^{ms}-ELISA war demnach nicht in der Lage, im Untersuchungszeitraum alle infizierten Tiere zu diagnostizieren. In der „C“-Virus-Gruppe waren im E2-ELISA 14 dpv 40% der Tiere positiv, während 21 dpv alle vakzinierten Tiere den Grenzwert überschritten, d.h. positiv getestet wurden (Abb. 66).

Abb. 66 CEDI-E2-ELISA, Gruppe 3 („C“-Virus)



Der E^{ms}-ELISA erkannte in dieser Gruppe nach Vakzination (21 und 28 dpv) nur 25% der immunisierten Schweine, während 49 dpv alle Tiere positiv waren (Abb. 67).

Abb. 67 CEDI-E^{ms}-ELISA, Gruppe 3 („C“-Virus)



Bei den KK kam es bis zum 28. dpv erwartungsgemäß zu keiner Serokonversion, damit werden die Befunde aus dem VNT bestätigt.

Dieses Ergebnis unterstreicht, dass keine Ausscheidung von Vakzinevirus zu verzeichnen war, weder bei den Markervakzinekandidaten noch bei der konventionellen „C“-Vakzine. Somit wird ein wichtiges Sicherheitskriterium für den Einsatz der Vakzinen unter Feldbedingungen erfüllt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle drei eingesetzten Impfstoffe („C“-Virus, CP7_E2alf, CP7_E1E2alf) die Impflinge vor klinischer Erkrankung sowie Virustransmission schützten, weshalb sich CP7_E2alf und CP7_E1E2alf auch für eine parenterale KSPV-Immunsierung eignen. Unter dem Aspekt der Anwendung dieser neuen Chimäre für die o.I., ist in weiteren In Vitro-Untersuchungen die Stabilität von flüssiger bzw. lyophilisierter CP7_E1E2alf-Formulierung zu überprüfen, um deren Eignung für die neue Köder-Vakzinekapsel-Kombination zu testen und das Virus CP7_E1E2alf als Grundlage für eine neue oral applizierbare Markervakzine zu validieren.

4.4.3.2.5. Pathologische-anatomische Befunde

Die pathologisch-anatomische Untersuchung erbrachte bei allen vakzinierten Tieren und den pv zugestellten KK, wie aus den klinischen Befunden sowie der virologischen und serologischen Resultate zu erwarten war, ein negatives Ergebnis.

Die Sektion der Infektionskontrollen ließ das Bild der KSP erkennen, mit blau-roten Verfärbungen der äußeren Haut (hauptsächlich Ohrspitzen und Gliedmaßen), Tonsillarnekrösen, Petechien auf den Nieren und der Harnblase, Milzrandinfarkten (Tier 22), geschwollenen und blutig imbibierten Lymphknoten, Bronchopneumonie sowie hämorrhagisch-nekrotisierender Enteritis, letztere bei Schwein Nr. 23.