

## 5. Zusammenfassende Diskussion

Die KSP-Kontroll- und Bekämpfungsstrategie der Europäischen Union basiert auf der Nichtimpfpolitik gegen diese Tierseuche, wobei der Grundgedanke dieser Strategie darauf beruht, dass nur lebende Schweine bzw. Schweinefleisch und Fleischprodukte von nachweislich KSP-freien Tieren in den Handel kommen dürfen. Dieser Grundstrategie folgend, dürfen nur Schweine gehandelt werden, die aus klinisch unverdächtigen Beständen stammen und frei von Ak sind.

Bis zur Einstellung der Impfung der Hausschweine in der EU waren die Bekämpfungsmaßnahmen in den einzelnen Staaten nicht einheitlich, wobei diese wesentlich von dem Vorkommen des KSPV in der Haus- und Wildschweinepopulation bestimmt wurden. In endemisch verseuchten Ländern war es daher durchaus üblich, Hausschweine prophylaktisch gegen KSP zu impfen, um hohe wirtschaftliche Verluste zu vermeiden (Beer et al., 1978; Kaden et al., 1985; Pejsak, 1998). Da es aber keine geeigneten diagnostischen Methoden gab und gibt, um mit konventionellem KSP-Impfstoff vakzinierter Tiere von durch Feldvirus infizierte Tiere auf Grund des gebildeten Ak-Musters zu unterscheiden, wurde eine gewisse Gefahr postuliert, dass sich das Feldvirus unerkannt unter der „Impfdecke“ ausbreiten kann. Auf Grund dessen erlauben Importländer meist keine Einfuhr von vakzinierter Tieren bzw. von Fleisch- und Wurstwaren geimpfter Schweine. Des Weiteren muss in dem betreffenden Exportland sichergestellt sein, dass innerhalb der letzten 12 Monate kein Fall von KSP aufgetreten ist. Um einen freien und weltweiten Handel zu gewährleisten, hat die EU daher in den 80er Jahren die Anti-Impfpolitik gegen strategische Tierseuchen, damit auch gegen KSP, beschlossen. Gemäß der nunmehr geltenden KSP-Bekämpfungsrichtlinie 2001/89/EG (Anonym, 2001), sind im Falle eines KSP-Ausbruchs bei Hausschweinen alle infizierten Tiere des Seuchenbetriebes sowie die Kontakt- bzw. Nachbarbestände zu töten. Wie Analysen in den Niederlanden während des Seuchenzuges 1997-1998 exemplarisch zeigten (Horst, 1998; de Smit et al., 2000; Terpstra und de Smit, 2000; Elbers et al., 2001), wurde nur eine Minderheit der Tiere auf Grund einer direkten Beteiligung am Seuchengeschehen gekeult, während der weitaus größere Teil der Schweine aus Tierschutzgründen (Platzmangel in den Ställen durch Transport- und Handelsverbot etc.) getötet werden musste. Wenngleich eine Notimpfung gemäß dieser Richtlinie nach Zustimmung der EU grundsätzlich möglich war, diese aber im Grunde bisher keine

Anwendung fand, erscheint mit der Entwicklung der ersten Generation von Markervakzinen eine Abänderung der geltenden Gesetzestexte möglich zu werden.

Eine streng definierte Applikation der Markervakzine verlangt aber auch nach einem engmaschigen serologischen Screening, um verdeckte Feldvirusinfektionen aufzudecken. Die Möglichkeit einer Notimmunisierung mit DIVA-Impfstoffen (van Oirschot, 2003) würde das ethisch fragwürdige Massenschlachten gesunder Tiere unnötig machen. Als Folge dessen ist zu erwarten, dass die öffentliche Akzeptanz der EU-Eradikationspolitik steigt und die wirtschaftlichen Kosten bei der KSP-Bekämpfung gesenkt werden können. Zwei Markervakzinen (Subunit-Vakzinen) sind momentan für den Einsatz beim Hausschwein im Handel. Auf beide Impfstoffe wird später nochmals eingegangen.

Die Bekämpfung der KSP in Schwarzwildbeständen ist problematischer und war bis vor einigen Jahren mehr oder weniger ungelöst (Laddomada, 2000). Die ständige Anwesenheit des Virus in der Wildtierpopulation sowie die sich daraus ergebende konstante Gefahr für die Hausschweinebestände der betreffenden Gebiete verlangten nach einer effizienten Kontrollstrategie. Diese beinhaltet in Deutschland zum einen eine intensive Bejagung und zum anderen eine Vakzination (endemisch) verseuchter Populationen (Kaden, 1998, 1999; Kaden et al., 2000, 2002; Laddomada, 2000).

In den in Deutschland durchgeführten Feldversuchen konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe der o.I., basierend auf einem Köder-Impfstoff in dem flüssiges „C“-Virus in Blistern enthalten ist, möglich ist, die Virusausbreitung einzudämmen (Kaden, 1993, 1996, 1998; Kaden et al., 1994; Hillmann und Kaden, 1994, 1995; Hillmann et al., 1996; Kaden und Lange, 1997, 1998). Hierbei zeigte es sich jedoch, dass insbesondere Frischlinge schwierig zu vakzinieren sind, während ältere Wildschweine den Impfköder besser aufnehmen, was anhand der höheren Seroprävalenzrate dieser Tiere ersichtlich wird (Kaden, 1999; Kaden et al., 2000, 2002, 2005c). Als Folge dessen, könnte KSPV in partiell geimpften Beständen „persistieren“ (Laddomada, 2000). Obwohl die Immunitätslage bei Frischlingen durch die dreifache Doppelimpfung (Frühjahr, Sommer, Herbst) verbessert werden konnte (Kaden et al., 2002, 2003b, 2005c), ist der Anteil serologisch positiver Frischlinge in den ersten Lebensmonaten nach wie vor niedriger als der älterer Wildschweine. Als Gründe für die schlechtere Seroprävalenzrate bei Frischlingen wird eine unzureichende Köderaufnahme infolge (a) Konkurrenz durch adulte Tiere (Kaden, 1999; Laddomada, 2000), (b) der Größe des konventionellen Köders (Kaden, 1999; Kaden et al., 2000) sowie (c) der offensichtlich späten

immunologischen Reife der Frischlinge (Kaden, 1999; Kaden und Lange, 1997; Kaden et al., 2002) angenommen.

Um eine erhöhte Anzahl immuner junger Frischlinge zu erreichen, kommen rein theoretisch zwei Wege in Frage: zum einen die Verlängerung des maternalen Schutzes über die Impfung der Muttersauen und zum anderen eine aktive Köderaufnahme durch die Jungtiere im frühen Lebensalter. Da die erstgenannte Variante durch die o.I. nicht erfüllt werden kann (Kaden et al., 1999; Kaden und Lange, 2004), war es Ziel dieser Arbeit, eine neue Köderformulierung zu entwickeln, um eine zeitigere Impfstoffaufnahme bei Jungtieren zu erreichen.

In den dargelegten Aufnahmestudien mit unterschiedlichen Köderformen und -größen bei Wild- und Hausschweinen konnte gezeigt werden, dass Tiere unter vier Monaten in der Haus- und Wildschweingruppe den kleinsten runden Köder (1,8 cm) bevorzugten, wohingegen Schweine unter drei Monaten unabhängig von Größe und Form keine Köder fraßen. Mit zunehmendem Alter verschob sich die Präferenz bei den Wildschweinen hin zum größeren Köder runder Form (3 cm).

Dieses Resultat weist darauf hin, dass es auf Grund physiologischer Gründe während der ersten drei Lebensmonate nicht gelingen wird, Frischlinge oral zu vakzinieren. Damit werden die von Kaden (1999) und Kaden et al. (1999, 2002, 2003b, 2005c) gemachten Beobachtungen mit dem gegenwärtigen Köderimpfstoff bestätigt. Die relativ späte Köderaufnahme (mit 3,5 Monaten) durch die Frischlinge kann möglicherweise auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die Tiere bis zum 3./4.Lebensmonat bei der Bache saugen, und erst ab diesem Alter aktiv feste Nahrung aufnehmen (Meynhardt, 1990).

Hausschweine werden bereits sehr früh von der Sau getrennt und mit pelletiertem oder anderweitig festem Aufzuchtfutter gefüttert. Sie sind somit früher als Wildschweine an feste Nahrung gewöhnt, was auch die frühere Aufnahme im Alter von 3 Monaten erklärt.

Die Frage, ob die Aufnahme durch Kirren mit Placeboködern verbessert werden kann, ist nur spekulativ zu beantworten. Während des ersten Feldversuches zur o.I. in Niedersachsen, wurden mit solch einer Vorkirrung bessere Ergebnisse erreicht (Kaden et al., 2000). Auch andere Autoren (Hone und Stone, 1989; McIlroy et al., 1989; Saunders et al., 1990; Loepelmann und Dedek, 1991; Loepelmann, 1994) konnten einen positiven Effekt auf die Köderaufnahmerate durch vorherige Placeboapplikation nachweisen. Ferner wurden in einem eigenen Tierversuch erfolgreich Placeboköder verfüttert, bei offensichtlich verbessertem Aufnahmeverhalten für Impfstoffköder.

Auf Grund der bestehenden physiologischen Besonderheiten kann die immunologische Lücke bis zum 3./4. Lebensmonat nicht durch Impfung dieser Altersklasse geschlossen werden.

Umso wichtiger ist es daher, die Bejagung von Frischlingen und trächtigen Bachen (aber keine Leitbachen!) zu intensivieren (Kern, 1997; Kern und Lahrmann, 1997; Kaden und Lange, 1997; Kaden, 1999; Laddomada, 2000).

Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse der Aufnahmestudien die Vermutung, dass kleinere Köder zu einer besseren Aufnahme führen (Kaden et al., 1997, 2000). Die runden Köder (1,8 cm) wurden in der Wildschweinegruppe mit 4,5 Monaten komplett und zügig aufgenommen, während die konventionellen größeren Köder bis zum Alter von 6 Monaten erst verzögert (nach einigen Minuten) aufgenommen wurden. Um eine optimale Köderaufnahme in der freien Natur zu gewährleisten, sollten daher zukünftig kleinere, jedoch kugelförmige Köder eingesetzt werden. Zudem ist die von Kaden et al. (2000) beschriebene Vergrößerung der Auslageplätze als zusätzliche Maßnahme zur optimierten Köderaufnahme, vor allem auch für Jungtiere, sinnvoll. Weiterhin könnte es von Vorteil sein, die gekühlten bzw. gefrorenen Köder vor der Auslage kurz auf Raumtemperatur zu erwärmen, damit Duft- und Aromastoffe ausreichend freigesetzt werden, wodurch die Attraktivität der Köder möglicherweise gesteigert werden kann.

Eine Verkleinerung des Impfköders und deren Produktion in Kugelform erfordert eine neue Vakzineformulierung verbunden mit einem veränderten Vakzinebehältnis. Da es aus technologischer Sicht nicht möglich ist, die benötigte Menge an lyophilisiertem Impfstoff in die Hartgelatine kapsel des kleinen Köders (1,8 cm) einzubringen, kam der 3 cm große kugelförmige Köder in den Vakzinationsversuchen zum Einsatz.

Eine der Voraussetzungen für die Verwendung dieses Köders mit lyophilisiertem Impfstoff im Tierversuch war jedoch, festzustellen, welche Stabilität die lyophilisierte Impfstoffkonfektionierungsform aufweist.

Daher fanden Stabilitätsuntersuchungen mit flüssigem und lyophilisiertem „C“-Virus sowie mit dem chimären Pestivirus CP7\_E2alf, dem möglicherweise zukünftigen Markervakzinekandidaten auch für die o.I., statt. Ziel dieser Studie war es einerseits, zu untersuchen, ob bzw. inwieweit die Viren im Gefriertrocknungsprozess beeinflusst werden (Titerabfall!) und andererseits, ob das Lyophilisat bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen und -bedingungen, denen es bei der Köderauslage ausgesetzt sein kann, im Titer stabil bleibt. Für diese Untersuchungen wurden die o.g. Vakzineviren unter Zuhilfenahme zweier unterschiedlicher Schutzmittel (TSM und GS 4) lyophilisiert.

Bei einem Vergleich von Flüssigvakzine und GS 4 lyophilisiertem „C“-Virus, waren über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 37°C und bei Raumtemperatur signifikant höhere Titer

( $p < 0,05$ ) beim Lyophilisat zu verzeichnen.

Wie erwartet, erwies sich lyophilisierte „C“-Vakzine bei höheren Umgebungstemperaturen stabiler als flüssige Vakzine ( $p < 0,05$  bei 24 und 37°C). Obwohl die Stabilität von „C“-Virus nach Lyophilisation mit dem Trockenschutzmittel GS 4 etwas höher zu liegen scheint, hat sich dies bei statistischer Bewertung nicht bestätigt, außer für die Umgebungstemperatur von 24°C ( $p < 0,05$ ). Bei Temperaturen zwischen 4 und 24°C und 7tägiger Verweildauer waren die Virustiter bei beiden Schutzmitteln relativ konstant. Im Gegensatz dazu, waren die ermittelten Virustiter bei Umgebungstemperaturen von 37°C bereits innerhalb kurzer Zeit etwas niedriger. Wenngleich der Virustiter unter Verwendung des Schutzmittels GS 4 bei dieser Temperatur innerhalb von 7 Tagen um 1  $\log_{10}$  sank, war der Titerabfall des „C“-Virus, lyophilisiert mit TSM, größer, ohne dass sich diese Differenz statistisch sichern ließ ( $p > 0,05$ ). Da der Virustiter von mit TSM lyophilisiertem „C“-Virus bei 37°C tendenziell jedoch einen stärkeren Abfall über einen Zeitraum von 7 Tagen hinaus erwarten lässt, sollte für eine zukünftige lyophilisierte „C“-Vakzine zur o.I. von Wildschweinen, der Schutzstoff GS 4 verwendet werden. Flüssiges „C“-Virus war bei Temperaturen über 20°C deutlich instabiler als lyophilisiertes Virus. Während es bei 24°C innerhalb von 4 Tagen zu einem Titerabfall von 2  $\log_{10}$  kam ( $p < 0,05$ ), wurde bei Lagerungstemperaturen von 37°C 6 Tage später kein Virus mehr in der Flüssigvakzine (mit TSM) gefunden. Diese Ergebnisse mit Flüssigvirus stimmen nicht überein mit früheren Untersuchungen (Kaden, persönliche Mitteilung). Möglicherweise liegt dies am Vermehrungssubstrat für das „C“-Virus, welches bei den Untersuchungen von Kaden auf primäre fötale Schweinenierenzellen zurückging, während die Virusvermehrung in den hier berichteten Untersuchungen in permanenten Schweinenierenzellen erfolgte.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen in der CP7\_E2alf-Gruppe sind grundsätzlich mit denen der lyophilisierten „C“-Vakzine vergleichbar. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) konnten für das Lyophilisat (TSM/GS 4) bei Raum- und Brutschranktemperatur im Vergleich mit der flüssigen Formulierung festgestellt werden, während zwischen den einzelnen Oralschutzmitteln keine Signifikanz nachweisbar war ( $p > 0,05$ ). Die Stabilitätsuntersuchungen mit beiden Vakzineviren haben daher bewiesen, dass im Vergleich zur flüssigen Vakzineformulierung durch die Lyophilisation der Viren ein stabiler Titer über einen längeren Zeitraum zu verzeichnen war. Flüssige Vakzineformulierungen waren vor allem bei hohen Temperaturen (Brutschrank 37°C) instabil, so dass bereits am 5. Tag („C“-Vakzine) bzw. an Tag 3 (CP7\_E2alf) kein Virus mehr nachgewiesen werden konnte. Da die Köder laut aktuellen Impfpfehlungen mindestens 5 Tage an den Auslageplätzen

verweilen sollen (Kaden et al., 1997), darf auch der Virustiter in den Ködern bis zu diesem Zeitpunkt nicht abnehmen. Die Gefriertrocknung der herkömmlichen Schweinepest-oralvakzine vom Stamm „C“ bzw. des chimären Pestivirus CP7\_E2alf, sofern es später für die o.I. zur Anwendung kommt, sollte demnach eine Verbesserung der o.I.-Methode bewirken, vor allem in endemisch verseuchten Ländern, in denen die o.I. auch bei hohen Sommertemperaturen durchgeführt werden muss, wie z.B. in Süd-/Südosteuropa (Rumänien, Bulgarien, Kroatien), ggf. auch in Mittel- und Südamerika oder in Asien.

Die vermehrte Aufnahme der kleineren Köder durch Frischlinge im Zusammenspiel mit der höheren Virusstabilität des Lyophilisates lässt im Ergebnis eine höhere Seroprävalenz sowie eine Reduktion der Anzahl empfänglicher Tiere erwarten und kann somit helfen, die Seuche rascher zurückzudrängen.

Der auch für die o.I. verwendete KSPV-Stamm „C“ hatte sich in den vergangenen Jahrzehnten durch seine positiven Eigenschaften als Notfallimpfstoff (KSP-Ausbruch) bei Hausschweinen bewährt. Er erwies sich auch dort als höchst effizient und führte bereits kurze Zeit nach Applikation zu einem soliden, lang anhaltenden Schutz vor klinischer Symptomatik sowie zum Verhindern von Virusreplikation und -exkretion innerhalb einer Woche nach Vakzination (Glaner et al., 1984; Kaden et al., 1985; Leopoldt und Tesmer, 1985; Biront et al., 1987; Kaden und Riebe, 2001).

Diese Eigenschaften scheinen hinsichtlich der o.I. sowohl für die Flüssigvakzine (Kaden und Lange, 2001; Kaden et al., 2001, 2004b) als auch, wie die dargelegten Untersuchungsergebnisse zeigen, für den lyophilisierten Impfstoff zuzutreffen.

Nach den Köderaufnahmestudien mit den neuen Köderformen und der Überprüfung der Stabilität der gefriergetrockneten Vakzinen, wurden Tierversuche mit der ausgewählten neuen Köderformulierung und „C“-Virus durchgeführt, da sich eine kurzfristige Praxislösung mit dem aktuellen Vakzinestamm anbieten dürfte. In diesem Kontext galt es, das Schutzpotenzial des gefriergetrockneten Impfstoffes zu überprüfen, wofür Haus- und Wildschweine mit zwei unterschiedlichen Impfvirusdosen (1 ID bzw. 2 ID) inokuliert und 28 dpv mit 100 bzw. 1.000 KID<sub>50</sub>/ml Challengevirus belastet wurden. Wie die vorliegenden Tierexperimente zeigen, waren alle Schweine, die den Köder ordnungsgemäß aufgenommen hatten, komplett vor einer KSPV-Infektion geschützt, d.h., es traten weder klinische Symptome bei diesen Tieren auf, noch waren diese virämisch bzw. schieden Belastungsvirus aus. Nur ein Tier (OM 363) aus dem zweiten Experiment (Challenge mit 1.000 KID<sub>50</sub>) wurde nach Infektion krank und musste mit typischen KSP-Symptomen moribund getötet werden. Dieses Schwein hatte den

Köder nicht gefressen, so dass versucht wurde, ihm das Lyophilisat manuell zu verabreichen, was offensichtlich nicht erfolgreich war, wie auch die ausgebliebene Immunantwort pv (keine Ak) zeigte. Nach Kaden et al. (1997) ist die Immunisierung gegen KSP über den Darmtrakt (GALT) zwar möglich, hinsichtlich des Impfstoffeinsatzes jedoch in Bezug auf die erforderliche Ag-Menge uneffektiver als die Aufnahme von Impfstoff nach Zerkauen der Vakzinekapsel und Benetzen des Schleimhautbereiches in Maulhöhle und Rachenraum. Um eine Immunität über den Darmtrakt aufzubauen, reichte bei diesem Tier (OM 363) die eingesetzte Virusdosis von  $10^{5,75}$  KID<sub>50</sub>/ml nicht sicher aus, so dass es klassische KSP-Symptome entwickelte und 11 dpi getötet werden musste. 75% der mit Lyophilisat immunisierten Tiere in dieser Studie waren jedoch vor einer KSPV-Infektion geschützt (keine Klinik, keine Ausscheidung von KSPV), während Tiere, die Flüssigimpfstoff appliziert bekamen, zu 100% vor einer Infektion geschützt waren. Es ist jedoch anzumerken, dass den Hausschweinen das Impfvirus oral mit einer Spritze eingegeben wurde, weil die Tiere auf Grund ihres Alters (unter vier Monate) keine spontane Aufnahme der konventionellen Köder zeigten. Somit wurde sichergestellt, dass alle Schweine die vollständige Ag-Menge erhielten. Wenngleich außer beim Schwein mit der OM 363 pi KSPV weder im Blut noch in den Tupferproben gefunden wurde, ergab die nRT-PCR bei der Untersuchung von NT-Proben bei einem Tier (OM 298, Hausschwein, 1 ID) am 7. dpi ein positives Ergebnis. Die angeschlossene Sequenzierung der isolierten RNA bewies, dass es sich nicht um die RNA des Challengevirus, sondern um die genetische Information des „C“-Virus (Impfstamm) handelt. Dass der Genomnachweis nicht bereits mit der „normalen“ RT-PCR gelang, kann mit der höheren Sensitivität der nPCR erklärt werden (Liu et al., 1991; Wirz et al., 1993; Harding et al., 1996; Lowings et al., 1997; Büttner und Ahl, 1998). Theoretisch reicht zwar ein einziges Template-Molekül für den Virusnachweis aus, in der Praxis ist es aber oftmals nötig, mit zwei weiteren Primern (z.B. utr51n: 5'-ACT CCA TGT GCC ATG TAC AG- 3', utr53n: 5'-ATA GTA GGA CTA GCA AAC GG- 3') und dem PCR-Produkt eine zweite PCR durchzuführen. Die Anzüchtung des „C“-Virus auf der Zelllinie 86 gelang erwartungsgemäß nicht (Das Tier hatte ohnehin Ak ausgebildet.), was beweist, dass es sich um kein aktives Virus handelt. Auch zeigt das Ergebnis der Sequenzierung, dass es zu keiner Interaktion von Impf- und Challengevirus gekommen ist, was die hohe Sicherheit des Impfstammes unterstreicht. Bisher sind in der Literatur nach o.I. mit „C“-Virus nur Fälle beschrieben, wo das Virus-Ag in lymphatischen Organen maximal bis zum Tag 16 (Lorena et al., 2001) pv nach parenteraler Vakzination von Hausschweinen nachgewiesen werden konnte. Das für die o.I. eingesetzte „C“-Virus wurde mittels VI bis zum 8./9. dpv (orale Applikation) festgestellt (Kaden et al.,

2004a), während Fischer et al. (1991) es nach parenteraler Impfung mit dem direkten IFT zwischen Tag 4 und 9 pv nachwies. Chenut et al. (1999) konnten nach oraler Verabreichung kein „C“-Virus aus Organproben isolieren. Diese unterschiedlichen Ergebnisse stehen möglicherweise im Zusammenhang mit unterschiedlichen „C“-Virusstämmen, einem unterschiedlichem Virusgehalt in der Applikationsdosis sowie dem Nachweisverfahren. Es erscheint also durchaus möglich, dass im Einzelfall bei Anwendung moderner PCR-Methoden (nPCR, Real-Time PCR) das Genom des Vakzinevirus bis zu 35 dpv nachzuweisen ist, möglicherweise auch noch länger. Da insbesondere die Real-Time PCR zurzeit in den meisten Untersuchungsämtern Deutschlands etabliert wird, ist bei einem Vorkommen positiver Fälle in Impfgebieten in den ersten Wochen nach Köderauslage auch an Impfvirus zu denken, d.h. alle PCR-Nachweise von klinisch gesunden Tieren sollten diesbezüglich abgeklärt werden.

Die erreichten Ak-Titer pv waren vergleichbar mit den Titern, die nach Verabreichung des bisherigen Köderimpfstoffes erzielt wurden (Kaden et al., 2004b, 2005c, 2006). Statistisch nachweisbare Titerunterschiede zwischen den Tiergruppen, die mit 1 ID bzw. 2 ID oral vakziniert wurden, waren nicht vorhanden ( $p > 0,05$ ). Zwei Tiere aus Experiment 1 serokonvertierten bis zum Ende des Versuchs nicht (OM 31 und OM 297). Der Grund für die ausgebliebene aktive Immunantwort könnte eine inkomplette Köderaufnahme oder Ausspucken der Kapsel gewesen sein. Trotz fehlender Ak-Bildung erwiesen sich beide Tiere jedoch als geschützt, wobei auch die VI (Tupfer, BC, Organe) negativ verlief. Dieser positive Ausgang bei Tieren ohne Ak wurde bereits in früheren Vakzinationsstudien gelegentlich festgestellt (Kaden, persönliche Mitteilung). Er ist im vorliegenden Fall höchstwahrscheinlich einerseits auf zellvermittelte und unspezifische Immunmechanismen (Pauly et al., 1995; Suradhat et al., 2001) bzw. andererseits auf die relativ niedrige Challengedosis (100 KID<sub>50</sub>/ml) zurückzuführen. So berichtete van Oirschot (2003) vom Auftreten Interferon- $\gamma$  sezernierender Zellen spezifisch für KSPV, welche nach Vakzination mit dem „C“-Stamm ab dem 6. Tag im peripheren Blut der Tiere gefunden wurden. Das Vorkommen dieser Zellen kann als Indikator für eine zellvermittelte Immunität angesehen werden.

Die Untersuchungen lassen zudem erkennen, dass innerhalb der ersten 14 dpv noch keine Ak ausgebildet wurden. Dies steht in Einklang mit den bisherigen Erfahrungen nach o.I. mit flüssigem „C“-Virus (Kaden und Lange, 2001; Kaden et al., 2004b). Nach Challenge wurde in allen Versuchsgruppen erwartungsgemäß ein signifikanter Anstieg der Ak-Titer festgestellt ( $p < 0,05$ ), während zwischen den einzelnen Tiergruppen kein Unterschied zu ermitteln war



( $p > 0,05$ ).

Wenngleich durch die Einführung einer Ködervakzine basierend auf lyophilisierter „C“-Vakzine und kugelförmigem Köder ein weiterer Fortschritt für die o.I. von Wildschweinen zu erwarten ist, so stellt dieser Impfstoff nach wie vor einen konventionellen Oralimpfstoff dar, welchem das Problem anhaftet, dass vakzinierte nicht von infizierten Tieren unterschieden werden können (DIVA-Strategie, van Oirschot, 2003). So unterstreicht auch Kretzdorn (1998), dass solche Markervakzinen zukünftig eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz in der Tierseuchenbekämpfung sein werden.

Im Moment gibt es zwei kommerziell verfügbare Subunit-Impfstoffe („Bayovac CSF Marker“ von der Bayer AG, „Porcilis Pesti<sup>®</sup>“ von Intervet International B.V.), die seit dem 09.06.2000 von der EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) in London registriert sind. In der Arbeit von Ziegler (2000) konnte gezeigt werden, dass beide Impfstoffe in der Lage waren, nach parenteraler Applikation die Dauer der Virämiephase zu reduzieren. Die Schweine, die 14 dpv infiziert wurden, entwickelten nur eine subklinische Verlaufsform der KSP. Die Transmission des Virus war reduziert, obwohl eine komplette Verhinderung der Virusübertragung selbst 21 dpv nicht möglich war. Wurde der Impfstoff tragenden Jungsauen in unterschiedlichen Gestationszeiträumen appliziert, konnten nach Vakzination weder systemische Reaktionen noch eine Beeinflussung der Fertilität der Tiere festgestellt werden (Ahrens et al., 2000). Die Impfung schützte bei 9 von 10 vakziniert-infizierten Sauen die Foeten vor einer Infektion mit dem schwach virulenten „Glentorf“-Stamm. Das Ergebnis zeigt, dass bei doppelt mit Porcilis Pesti<sup>®</sup> immunisierten und im Anschluss infizierten Sauen die Virustransmission auf die Nachzucht in 90% der Fälle verhindert wurde (Ziegler, 2000; Ahrens et al., 2000; Ziegler und Kaden, 2002). Ähnliche Ergebnisse erzielten Moormann et al. (1998) mit der anderen E2-Subunit-Vakzine. Sie berichten in ihren Untersuchungen von einem 100% Schutz der Foeten bei Doppelvakzination der Sauen. Werden die Tiere einmal vakziniert, konnte in 10% der Fälle eine Virustransmission nachgewiesen werden. Neutralisierende Ak nach Impfung mit Porcilis Pesti<sup>®</sup> zeigten sich später als nach Immunisierung mit konventioneller „C“-Vakzine (Ahrens et al., 2000), weswegen sich der Impfstoff nicht für den parenteralen Einsatz in infizierten Schweinebeständen eignet. Eine etwaige Einsatzkonzeption bei Hausschweinen wäre für enzootisch verseuchte Gebiete bzw. für permanent gefährdete Regionen denkbar.

Da es sich bei beiden Subunit-Vakzinen um Totimpfstoffe handelt, eignen sich diese jedoch nicht zur o.I. von Wildschweinen (siehe auch frühere Anmerkung zur Ag-Dosis). Hierfür sind Lebendimpfstoffe notwendig.

Erste Entwicklungsschritte in Richtung potentieller Markervakzinen zur o.I. gingen Hammond et al. (2001a, 2003). Sie immunisierten Hausschweine mit einem rekombinanten porcinen Adenovirus, welches das E2-Gen des KSPV exprimiert, während Maurer et al. (2005) später mit Replikons, basierend auf einem cDNA-Klon des KSPV-Stammes „Alfort 187“ (Ruggli et al., 1996) arbeiteten. In Deutschland beschäftigten sich Reimann et al. (2003, 2004) mit der Herstellung eines chimären Pestivirus. Sie nahmen das „Grundgerüst“ des cytopathogenen BVDV (Meyers et al., 1996), deletierten das BVDV-E2-Gen und integrierten im Anschluss das Gen des E2-Proteins (Hauptimmunogen) des KSPV „Alfort 187“ in das BVDV (CP7\_E2alf). Reimann et al. berichteten 2004 über die Wirksamkeit von CP7\_E2alf nach parenteraler Applikation an fünf Hausschweine und anschließender Belastungsinfektion mit  $1 \times 10^8$  KID<sub>50</sub>/ml des „Eystrup“-Stammes. Die Chimäre erwies sich als avirulent. Klinische Symptome, Leukopenie, Fieber und eine Übertragung von Impfvirus auf KK konnten pv nicht festgestellt werden. Auch nach der Challenge-Infektion blieben alle Tiere gesund und zeigten weder eine Virämie noch schieden sie Challengevirus aus. König et al. (2006) untersuchten diesen Markervakzinekandidaten hinsichtlich seiner Eignung für die o.I. der Wildschweine, indem sie drei Wildschweine mit  $6,3 \times 10^6$  KID<sub>50</sub>/ml CP7\_E2alf in flüssiger Form mit Hilfe einer Spritze immunisierten. Auch bei dieser Applikationsform wiesen die Wildschweine weder klinische Symptome noch einen Abfall der Leukozytenpopulation auf. CP7\_E2alf erwies sich also auch bei den Wildschweinen als unschädlich. Alle Tiere waren nach Infektion mit KSPV „Koslov“ ( $10^6$  KID<sub>50</sub>/Tier) vor KSP geschützt, obwohl die Ak-Spiegel bei der Infektion noch sehr gering waren. Ein Tier zeigte in diesem Tierexperiment für eine kurze Zeit eine moderate Leukopenie verbunden mit leichten Anorexie und Apathie-Symptomen (5 dpi), die möglicherweise auf die Challenge-Infektion zurückzuführen sind.

Diese ersten Ergebnisse zur oralen Vakzination zeigen, dass der mit CP7\_E2alf erreichte Schutz nicht so effektiv ist, wie dies nach einmaliger o.I. mit konventioneller Ködervakzine („C“-Virus) der Fall war (Kaden und Lange, 2001).

Um den Einsatz dieses chimären Pestivirus als „Markervakzinekandidat“ für die neue Lyophilisat-Köderformulierung zu überprüfen, wurde in einem weiteren Tierversuch mit Haus- und Wildschweinen lyophilisiertes CP7\_E2alf-Virus in den neuen Köder verbracht und dieser an die Tiere verfüttert. Nach Vakzination zeigten weder die Wild- noch die Haus-

schweine klinische Erscheinungen, bei Ausbleiben einer Virämie und Virusausscheidung. Ebenso blieben die Leukozytenwerte pv konstant, was die erwartete Unschädlichkeit des CP7\_E2alf-Lyophilisates bestätigt. Nach Challenge-Infektion am 28. dpv mit dem hoch virulenten „Koslov“-Stamm ( $10^6$  KID<sub>50</sub>/ml) starben innerhalb weniger Tage alle oral mit lyophilisiertem CP7\_E2alf immunisierten Schweine (9. dpi-15. dpi), ohne vorher ausreichend neutralisierende Ak gebildet zu haben. Im Gegensatz dazu serokonvertierten alle „C“-Virus geimpften Schweine bis zum 14. dpv, bis auf ein Tier, welches die Kapsel mit dem Impfstoff unvollständig aufgenommen hatte. Ein möglicher Grund für das Versagen der Köderimpfung beim lyophilisierten Vakzinevirus CP7\_E2alf könnte in der angewandten Viruskonzentration zu suchen sein. Möglicherweise wurde mit dem Vakzinevirustiter von  $10^{5,6}$  KID<sub>50</sub>/ml die MID nicht erreicht. Allerdings war bei lyophilisiertem „C“-Virus ein noch geringerer Titer ( $10^{5,1}$  KID<sub>50</sub>/ml) ausreichend, um einen kompletten KSP-Schutz zu induzieren. Bei dem Versuch von König et al. (2006) reichten  $6,3 \times 10^6$  KID<sub>50</sub>/ml aus, um die Tiere vor einer KSPV-Infektion zu schützen. Allerdings erfolgte die Impfung, wie bereits erwähnt, in diesem Fall mit 2 ml Flüssigvakzine, die oral mittels Spritze verabreicht wurde, so dass man sicher sein konnte, dass die Schweine die gesamte Ag-Menge aufnahmen. Bei der Köderimpfung besteht grundsätzlich die Gefahr, dass die Vakzinekapsel nicht ordnungsgemäß zerbissen bzw. sie wieder herausgebracht wird. In beiden Fällen kommt es zu keiner optimalen Vakzination bzw. zum Ausbleiben des Immunisierungseffektes. Ein weiterer Grund für den fehlenden Schutz könnte in der nicht optimalen Genomstruktur des chimären Virus CP7\_E2alf liegen. Möglicherweise reicht das E2-Hüllprotein alleine beim lyophilisierten Virus nicht aus, um die Bildung protektiver Ak zu induzieren oder die Dimerisierung zwischen dem BVDV-E1-Gen und dem KSPV-E2-Gen funktioniert nicht optimal, wie später noch im Detail zu erläutern sein wird. Das „C“-Virus wiederum, besteht aus einem kompletten attenuierten KSPV mit einem homologen E1-E2-Heterodimer, woraus sich möglicherweise die bessere Aktivierung des Immunsystems erklärt, wie der komplette Schutz der oral mit lyophilisiertem „C“-Virus vakzinierten Schweine zeigt.

Da die mit CP7\_E2alf geimpften Tiere bis auf ein Hausschwein (OM 263) am Tag der Infektion (28 dpv) noch keine neutralisierenden Ak ausgebildet hatten, sie innerhalb kurzer Zeit pi erkrankten und verendeten bzw. moribund getötet wurden, war es nicht möglich, die Sensitivität und Spezifität des CEDI-E<sup>ms</sup>-ELISA's zu überprüfen. Daher ist es in zukünftigen Tierexperimenten notwendig, den diskriminierenden E<sup>ms</sup>-ELISA nach Einsatz dieses Markervakzinekandidaten mit höherem Virusgehalt pro Oralvakzinedosis und unter Bewertung der in praxi stattfindenden Boosterimmunisierungen zu bewerten. König et al.

(2006) konnten jedoch in ihrem oralen Immunisierungsexperiment mit flüssigem CP7\_E2alf-Virus bis zum Zeitpunkt der Challenge keine Ak im E<sup>ms</sup>-Marker-ELISA (CEDI Lelystad) feststellen, nach Infektion war dies möglich, so dass mit diesem Test eine serologische Differenzierung zwischen Feld- und Impfvirus möglich werden sollte.

Um die immunogene Wirkung von CP7\_E2alf zu erhöhen, wurde daher am FLI das chimäre Pestivirus CP7\_E2alf im o.g. Sinne weiterentwickelt, wobei in das BVDV (backbone) das E1-Gen vom KSPV „Alfort 187“ anstelle des E1-Gens des BVDV eingebaut wurde. Die Glykoproteine E1 und E2 in einem kompletten KSPV haben Transmembrandomainen (Weiland et al., 1990) und liegen, über Disulfidbrücken verbunden, als E1-E2-Heterodimer vor (Weiland et al., 1990; Wensvoort et al., 1990; Rümenapf et al., 1993). Diese Dimerisierung zwischen den beiden SP spielt eine entscheidende Rolle im Lebenszyklus eines Viruspartikels, vor allem für die Bindung an Zellrezeptoren und die Assembly der Virionen. Weiterhin wird vermutet (Rümenapf et al., 1993), dass die verschiedenen Dimerformen innerhalb der SP wichtig sein könnten für die protektive KSP-Immunität (volle Ausbildung der Wirkung des E2-Proteins hinsichtlich Ausbildung neutralisierender Ak). Beide Hüllproteine (E1, E2) sind demnach wichtig für das Eindringen des Virus in die Wirtszelle (Wang et al., 2004), so dass ein chimäres Pestivirus, welches die SP E1 und E2 vom KSPV enthält (Stamm „Alfort“), zu einer besseren Replikation im Wirt und somit zu einer besseren Immunreaktion befähigt sein könnte. Möglicherweise war, wie bereits berichtet, die Dimerbildung zwischen dem E1-Gen vom BVDV und dem E2-Gen vom KSPV nicht stark (effektiv) genug, so dass es bei der oralen Impfung der Tiere mit lyophilisiertem CP7\_E2alf-Virus zu keiner ausreichenden Induktion einer protektiven Immunität kam.

Die parenterale Verabreichung des neu konstruierten Makervakzinekandidaten CP7\_E1E2alf sollte überprüfen, inwieweit sich dieser am Tier als unschädlich erweist und ob er in der Lage ist, eine Immunität zu erzeugen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Vakzination mit CP7\_E1E2alf keinen negativen Einfluss auf die Gesundheit der Schweine ausübt. Gleiches wurde erwartungsgemäß für die Chimäre CP7\_E2alf und das „C“-Virus festgestellt. Interessanterweise hatten die ersten Tiere in allen drei Gruppen bereits am 7. dpv niedrige Ak-Titer, deutlich früher als nach oraler Vakzination. Am Tag der Challenge (28 dpv) wiesen die mit CP7\_E1E2alf vakzinierten Schweine die höchsten neutralisierenden Ak-Titer (im Mittel 1:213) auf, gefolgt von der „C“-Vakzine-Gruppe (im Mittel 1:80) und der CP7\_E2alf-Gruppe (im Mittel 1:78). Da 28 dpv ein

statistisch sicherbarer Unterschied ( $p < 0,05$ ) zugunsten der Titer in der CP7\_E1E2alf-Gruppe zu verzeichnen war, kann angenommen werden, dass sich dieses Konstrukt als optimaler hinsichtlich der Ausbildung neutralisierender Ak erweist. Die mit CP7\_E2alf und „C“-Virus vakzinierten Schweine hatten etwa gleich hohe Ak-Titer zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion. Nach Challenge waren alle Hausschweine vor einer Infektion geschützt, wie alle virologischen Untersuchungsbefunde zeigten. Dies beweist, dass die niedrigeren Ak-Titer in der CP7\_E2alf- und „C“-Virus-Gruppe von ausreichender Höhe waren, um einen kompletten Schutz zu induzieren, wie auch frühere Experimente gezeigt hatten. Im Gegensatz zu den mit „C“-Virus vakzinierten Schweinen konnte mit Hilfe der Real-Time PCR allerdings in den Tonsillen aller Schweine der Gruppen 1 (CP7\_E1E2alf) und 2 (CP7\_E2alf) Virusgenom festgestellt werden, welches sich nach Sequenzierung als Challengevirusgenom erwies (Strebelow, persönliche Mitteilung). Ähnliche Beobachtungen machten Kaden et al. (2007, in press), als sie von mit flüssigem CP7\_E2alf oral immunisierten Tieren MLK/DLK und Tonsillen in der Real-Time PCR untersuchten und alle vakziniert-infizierten Wildschweine zu Versuchsende virale RNA in Tonsille und MLK hatten, während bei zwei von drei Tieren der Genom-Nachweis auch in den DLK gelang. Die Sequenzierung der aufgearbeiteten RNA bestätigte die Vermutung, dass es sich auch hierbei um Challengevirus handelt. Diese Real-Time PCR-Ergebnisse unterstreichen u.a. die extrem hohe Sensitivität dieser diagnostischen Methode (Hoffmann et al., 2005, 2006; Haegeman et al., 2006), welche auch durch die Gegenwart neutralisierender Ak nicht negativ beeinflusst wird. Wenngleich auf Grund der virologischen Untersuchungen (VI) davon ausgegangen werden kann, dass von diesen Challengevirusgenom tragenden Tieren keine unmittelbare Ansteckungsgefahr für Kontakttiere ausgehen sollte, so sind diese Befunde jedoch weiterhin kritisch zu validieren. 21 Tage nach Infektion entwickelten alle mit CP7\_E1E2alf vakzinierten Schweine sehr hohe Ak-Titer (im Mittel 1:26.816). Sie übertrafen im direkten Vergleich die Titer in der „C“-Vakzine-Gruppe (im Mittel 1:5.081).

Die mit CP7\_E2alf vakzinierten Schweine erreichten im Durchschnitt am 21 dpi die höchsten Titer (1:45.434). In diesem Tierversuch erkannte der diskriminierende E<sup>ms</sup>-ELISA bis zur Belastungsinfektion am 28. dpv alle mit CP7\_E2alf und CP7\_E1E2alf geimpften Schweine als negativ und beweist somit in diesem Teilbereich seine Eigenschaften als diskriminierender ELISA. Was die mit „C“-Virus vakzinierten Schweine betrifft, so waren pv überraschenderweise die meisten Tiere im E<sup>ms</sup>-ELISA ebenfalls negativ, obwohl dieses Vakzinevirus unverändert war, d.h. das originäre E<sup>ms</sup>-Gen enthält. Der Test war zudem nicht fähig, nach Challenge alle infizierten Schweine sicher zu erkennen. Ab dem 7. dpv wurden in

der CP7\_E1E2alf-Gruppe die Tiere 29 und 30 als positiv erkannt und am 21. dpi das Schwein 33. Von den mit CP7\_E2alf vakzinierten Läufern reagierten nur die OM 35 am Tag 10 pi im ELISA positiv, während das Schwein 34 erst ab Tag 21 pi positiv getestet wurde. Das bedeutet, dass sich dieser ELISA auf Grund der fehlenden Sensitivität demnach noch nicht für das sichere Detektieren von mit CP7\_E2alf und CP7\_E1E2alf vakzinierten und anschließend infizierten Tieren eignet. Es bedarf daher einer weiteren Verbesserung, da es nicht lohnend ist, Markervakzinen ohne effizientes diskriminierendes Testsystem einzusetzen.

Es bleibt abzuwarten, wie stabil sich dieser neue Markerkandidat CP7\_E1E2alf in weiteren In Vitro-Versuchen erweisen wird und ob er bei oraler Verabreichung in lyophilisierter Form via Köder in der Lage ist, Tiere vor der Seuche zu schützen. Zurzeit laufen am FLI erste viel versprechende o.I.-Versuche mit flüssigem CP7\_E1E2alf an Haus- und Wildschweinen, welche nach Belastung mit einer letalen Dosis KSPV gesund blieben (Kaden, persönliche Mitteilung). Sollte es mit einem lyophilisierten Markerkandidaten dauerhaft gelingen, Schweine oral erfolgreich zu immunisieren, so könnte der neue kugelförmige Köder eine optimale Vakzineformulierung sein, die es ermöglichen sollte, die Frischlinge etwas früher zu immunisieren als mit dem gegenwärtigen Köder. Zudem sollte sich lyophilisierter Impfstoff als eine umweltstabilere Formulierung erweisen (im Vergleich zur Flüssigvakzine) sowie die Möglichkeit bieten, bei Vorliegen eines effizienten Markertests (ELISA's) zwischen geimpften und infizierten Tieren zu unterscheiden. Unter diesen Bedingungen könnte die Anwendung der o.I. bei Wildschweine gegen KSP möglicherweise noch größere Verbreitung erlangen. Das Vorliegen von sensitiven und spezifischen Diagnostik-Tests für DIVA-Vakzinen ist daher die Grundlage für eine zeitlich begrenzte Impfstrategie im Seuchenfall und die Voraussetzung für einen möglicherweise freien Handel (EU- bzw. weltweit) vakzinierter Tiere (Kretzdorn, 1998; Moennig et al., 2003) bzw. von Fleisch/Wildbret dieser Tiere.

Die Vakzination mit DIVA-Impfstoffen stellt somit eine Alternative zur Nichtimpfpolitik dar. Diese sollten in der Lage sein, die aktuellen Bekämpfungsmaßnahmen sinnvoll zu ergänzen, zumal die Tötung gesunder Tiere von der Bevölkerung aus ethischen und tierschützerischen Gründen immer weniger toleriert wird. Mit Hilfe der Real-Time PCR, deren Sensitivität der VI entspricht bzw. diese sogar übertrifft, können große Probenmengen innerhalb kurzer Zeit (Testdauer ein Tag) und damit auch das Einzeltier auf Erregerfreiheit untersucht werden. Durch diesen Fortschritt auf dem Gebiet der KSP-Diagnostik und Bekämpfung sind die Voraussetzungen für neue Wege in der Bekämpfung der KSP gegeben.