

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Insel Riems
und dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Orale Immunisierung von Schwarzwild
gegen Klassische Schweinepest in Mecklenburg–Vorpommern.
Auswertung der ersten vier Immunisierungsperioden
in drei Gebieten**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Utta Schurig
Tierärztin aus Merseburg

Berlin 1999
Journal- Nr. 2271

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ. – Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter: Univ. – Prof. Dr. D. Ebner
Zweiter Gutachter: Dir. u. Prof. Dr. V. Kaden
Dritter Gutachter: Priv. – Doz. Dr. E. Uecker

Tag der Promotion: 11. 06. 1999

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Anz.	Anzüchtung
AZM	Anzüchtungsmedium
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
d	dies, diei (Tag, Tage)
DIFT	Direkter Immunfluoreszenztest
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
EM	Erhaltungsmedium
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
fragl	fragliche Reaktion
HPLC	High pressure liquid chromatography
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
IPMA	Immun-Peroxidase-Monolayer-Assay
KID	Kultur-Infektiöse Dosis
KM	Körpermasse
KSP	Klassische Schweinepest
KSPV	Virus der Klassischen Schweinepest
KT	Körpertemperatur
LK	Landkreis
LVL	Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt
mAk	monoklonale(r) Antikörper
n.a.	nicht auswertbar
neg	negative Reaktion
n.d.	nicht durchgeführt
o. b. B.	ohne besonderen Befund
o.I.	orale Immunisierung
OTC	Oxytetracyclin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
p.i.	post infectionem

PKSU	Porcine Kidney Soviet Union (permanent mit KSPV infizierte Schweinenieren-Zelllinie)
pos	positive Reaktion
p.v.	post vaccinationem
RIAM GmbH	Riemser Arzneimittel GmbH
RT	Reverse transcription
Tab.	Tabelle
TC	Tetracyclin
vgl.	vergleiche
VNT	Virusneutralisationstest

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Das Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV)	3
2.1.1. Taxonomie und morphologische sowie genomische Charakterisierung	3
2.1.2. Genprodukte des KSPV	3
2.1.3. Antigene Reaktionsmuster	4
2.2. Infektion mit dem Virus der KSP	5
2.2.1. Pathogenese	5
2.2.2. Verlaufsformen der KSP und klinisches Bild	5
2.2.3. Pathologie	8
2.2.4. Immunologie	9
2.3. Verbreitung und derzeitiges Auftreten der KSP	10
2.3.1. Hausschwein	10
2.3.2. Wildschwein	11
2.4. Biologie des Schwarzwildes und dessen Rolle im KSP-Geschehen	12
2.4.1. Biologie des Schwarzwildes	12
2.4.1.1. Revier und Rotte	12
2.4.1.2. Nahrung	14
2.4.1.3. Rangordnung und Sozialverhalten	14
2.4.1.4. Fortpflanzung	16
2.4.2. Epidemiologische Rolle des Schwarzwildes	17
2.5. Bekämpfung der KSP	17
2.5.1. Grundlagen der Tierseuchenbekämpfung	17
2.5.2. Immunisierungsmaßnahmen	19
2.5.2.1. Hausschwein	19
2.5.2.2. Wildschwein	22
2.6. Marker als Detektionssystem zur Überprüfung der Impfstoffaufnahme	26
2.6.1. Tetracycline	26
2.6.1.1. Pharmakologie der Tetracycline	26

2.6.1.2.	Eignung der Tetracycline als Marker	26
2.6.1.3.	Methoden des Nachweises von Tetracyclin im Knochen	27
2.6.2.	Weitere Markersubstanzen	28
2.7.	Serologische und virologische Nachweisverfahren der KSPV-Infektion	29
2.7.1.	Nachweis von Antikörpern gegen KSPV	29
2.7.2.	Nachweis von KSPV-Antigen	30
3.	Material und Methoden	32
3.1.	Verwendete Materialien	32
3.1.1.	Zelllinien	32
3.1.2.	Zellkulturmedien laut Zellbank der BFAV Insel Riems	33
3.1.3.	Virusstämme	33
3.1.4.	Puffer und Lösungen	33
3.1.5.	Chemikalien	34
3.1.6.	Konjugate und Seren	35
3.1.7.	Geräte	36
3.2.	Impfantigen	36
3.2.1.	Vakzinevirus	36
3.2.2.	Charakterisierung der eingesetzten Impfstoffchargen	36
3.3.	Impfstoffköder	37
3.3.1.	Köderzusammensetzung	37
3.3.2.	Herstellung des Impfstoffköders	37
3.4.	Orale Immunisierung (o. I.) in Mecklenburg-Vorpommern	38
3.4.1.	Immunisierungsgebiet	38
3.4.1.1.	Auswahlkriterien und Ausgangsstatus der besonderen Untersuchungsgebiete	39
3.4.2.	Organisation und Durchführung der oralen Immunisierung	39
3.4.2.1.	Köderauslagen	39
3.4.2.2.	Analyse der Köderaufnahme	42
3.4.2.3.	Probenziehung und Erfassung eingegangener Proben	42
3.5.	Nachweis des Virus der Klassischen Schweinepest	43
3.5.1.	Aufbereitung der Proben zur Untersuchung	43
3.5.1.1.	Organproben	43
3.5.1.2.	Knochenmarksproben	43

3.5.1.3.	Vollblutproben	44
3.5.1.4.	Buffy coat	44
3.5.1.5.	Nasentupfer	44
3.5.2.	Virusnachweis in der Zellkultur	45
3.5.2.1.	Behandlung und Erhaltung der Zelllinien	45
3.5.2.2.	Anzüchtung des KSPV in der Zellkultur	46
3.5.2.3.	Virusnachweis mittels indirektem Immunperoxidase-Monolayer-Assay (IPMA)	47
3.5.3.	Nachweis von KSPV im Knochenmark	48
3.5.3.1.	Direkter Immunfluoreszenztest (DIFT)	48
3.5.3.2.	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	48
3.5.4.	Virusnachweis mittels Polymerasekettenreaktion	49
3.5.4.1.	Isolierung der RNA	49
3.5.4.2.	Reverse Transkription und Amplifikation	50
3.5.4.3.	Analyse der amplifizierten DNA	51
3.6.	Nachweis von KSPV-spezifischen Antikörpern im Serum von Haus- und Wildschweinen	52
3.6.1.	CTB-ELISA-System	52
3.6.2.	Indirekter Immunfluoreszenztest	54
3.7.	Nachweis von Oxytetracyclin in Knochen	55
3.7.1.	Mikroskopischer Nachweis	55
3.7.2.	Untersuchung mittels HPLC	55
3.8.	Bestimmung von Blutbildparametern	56
3.8.1.	Leukozytenbestimmung	56
3.8.2.	Thrombozytenbestimmung	56
3.9.	Tierversuche	57
3.9.1.	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	57
3.9.2.	Untersuchung zur Antikörperentwicklung nach o.I. gegen KSP bei anschließender Challengeinfektion	57
3.9.2.1.	Verwendete Antigene	57
3.9.2.2.	Versuchsablauf	58
3.9.3.	Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit hochvirulentem KSPV geringer Dosis	58
3.9.3.1.	Verwendete Antigene	58

3.9.3.2.	Versuchsablauf	58
3.9.4.	Wirksamkeit der o. I. bei gleichzeitiger Infektion mit schwachvirulentem KSPV	59
3.9.4.1.	Verwendete Antigene	59
3.9.4.2.	Versuchsablauf	59
4.	Ergebnisse	61
4.1.	Feldversuch o. I. gegen KSPV bei Schwarzwild in Mecklenburg-Vorpommern	61
4.1.1.	Untersuchung auf das Vorhandensein KSPV-spezifischer Antikörper	61
4.1.1.1.	Landkreis Güstrow	61
4.1.1.2.	Landkreis Müritz	68
4.1.1.3.	Landkreis Ostvorpommern	75
4.1.1.4.	Zusammenfassung nach Untersuchungsgebieten und Altersklassen	82
4.1.2.	Wiederfindung des Markers Oxytetracyclin (OTC)	85
4.1.2.1.	Korrelation der Ergebnisse mit den Antikörperbefunden	85
4.1.2.1.1.	Landkreis Güstrow	85
4.1.2.1.2.	Landkreis Müritz	88
4.1.2.1.3.	Landkreis Ostvorpommern	91
4.1.2.2.	Vergleich der Ergebnisse verschiedener Nachweismethoden des OTC	94
4.1.3.	Untersuchung auf KSPV-Antigen	96
4.1.3.1.	Landkreis Güstrow	96
4.1.3.2.	Landkreis Müritz	102
4.1.3.3.	Landkreis Ostvorpommern	106
4.1.4.	Vergleich der KSP-Virusinzidenzen mit den Antikörperprävalenzen	110
4.2.	Untersuchung zur Antikörperentwicklung nach o.I. gegen KSP bei anschließender Challengeinfektion	115
4.2.1.	Auftreten KSPV-spezifischer Antikörper	115
4.2.2.	Schutzwirkung	115
4.2.3.	Nachweis von Impf- bzw. Challengevirus	116
4.2.4.	Untersuchungen des Blutbildes	116
4.3.	Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit hochvirulentem KSPV geringer Dosis	119
4.3.1.	Klinische Symptome in der Versuchs- und Kontrollgruppe	119

4.3.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	122
4.3.3.	KSPV-Nachweis	124
4.3.4.	Antikörperentwicklung	126
4.3.5.	Untersuchungen des Blutbildes	126
4.4.	Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit einem schwachvirulenten KSPV-Isolat	129
4.4.1.	Klinische Symptome	129
4.4.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	131
4.4.3.	KSPV-Nachweis	132
4.4.4.	Antikörperentwicklung	134
4.4.5.	Untersuchungen des Blutbildes	134
5.	Diskussion	137
5.1.	Feldversuch o.I. in Mecklenburg-Vorpommern	137
5.1.1.	Bewertung der Antikörper- und Antigenbefunde	137
5.1.2.	Antikörperprävalenzen und OTC-Nachweisrate	143
5.1.3.	Einschätzung des Immunisierungserfolges und Hinweise zu aufgetretenen Problemen	148
5.2.	Begleitende tierexperimentelle Untersuchungen	153
5.2.1.	Untersuchung zur Antikörperentwicklung nach o.I. gegen KSP bei anschließender Challengeinfektion	153
5.2.2.	Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit hochvirulentem KSPV geringer Dosis	154
5.2.3.	Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit einem schwachvirulenten KSPV-Isolat	157
5.3.	Methodische Anmerkungen	159
6.	Zusammenfassung	161
7.	Summary	164
8.	Literaturverzeichnis	166

Anhang

1. Einleitung

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine seit dem Jahr 1833 (Schütz, 1888) bekannte Tierseuche und auch heute noch bis auf wenige dauerhaft freie Gebiete weltweit verbreitet. Sie wird durch Infektion mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) hervorgerufen. Ihre Bedeutung ergibt sich aus dem großen ökonomischen Schaden, der insbesondere in Ländern mit intensiver Schweinehaltung volkswirtschaftliche Dimensionen erhält. Aus diesem Grunde wurde vor ca. 30 Jahren in verschiedenen Ländern eine Impfung der Hausschweinebestände mit einem attenuierten lapinisierten Lebendimpfstoff eingeführt. Da dies zu Exportbeschränkungen führte, ist die Impfung seit dem 1.1.1992 EU-weit verboten, so daß derzeit veterinärhygienische und seuchenpolizeiliche Maßnahmen zur Vorbeugung und Bekämpfung dieser Schweineseuche angewandt werden.

Eine nicht unbedeutende Rolle in der Epidemiologie der KSP spielen in einigen Staaten Wildschweine, die gleichermaßen wie die Hausschweine von der Seuche betroffen sein können. Einige Ausbrüche bei Hausschweinen konnten auf den indirekten bzw. direkten Kontakt mit erkrankten Wildschweinen zurückgeführt werden. Das Schwarzwild wiederum infiziert sich nicht nur gegenseitig, sondern auch über das Hausschwein, wobei Speiseabfällen eine große Bedeutung zukommt.

Im Jahre 1993 trat bei Schwarzwild im Land Mecklenburg-Vorpommern erstmals nach etwa zehn Jahren wieder KSP auf. Zeitgleich wurde ein Seuchengeschehen in den Hausschweinebeständen festgestellt, wobei in vielen Fällen infiziertes Schwarzwild als Einschleppungsursache ermittelt bzw. vermutet wurde. Dies stellte den Ausgangspunkt für Überlegungen dar, mittels eines Feldversuches in Mecklenburg-Vorpommern weitere Erkenntnisse über die Anwendungsmöglichkeit der oralen Immunisierung (o.I.) von Schwarzwild gegen das KSPV zu sammeln und gleichzeitig einen Beitrag zur Bekämpfung der KSP in der Wildtierpopulation zu leisten. Dieser Feldversuch sollte sich vor allem in seinem Umfang und der Zielstellung vom ersten Feldversuch in Niedersachsen im Jahre 1993 unterscheiden. Ziel des Feldversuches in Mecklenburg-Vorpommern war es, die Wirksamkeit der o.I. in einem sehr großen Immunisierungsgebiet bei Beibehaltung der seuchenhygienischen und veterinärpolizeilichen sowie jagdlichen Maßnahmen zu überprüfen. Dieses Immunisierungsgebiet war als „Cordon Sanitaire“ um die „Wildschweinpest“-gefährdeten Gebiete angelegt. Unser Augenmerk richtete sich dabei hinsichtlich der Bewertung des Immunisierungserfolges auf die Entwicklung der spezifischen

Antikörperprävalenz sowie auf den Nachweis von KSPV. In Zusammenarbeit mit dem Ministerium für Landwirtschaft und Naturschutz des Landes Mecklenburg-Vorpommern sowie dem Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern wurde die Umsetzung dieses Vorhabens konzipiert und Ende 1994 erstmals die o. I. des Schwarzwildes in bestimmten Gebieten durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine Auswertung des Feldversuches in den ersten beiden Jahren der Immunisierung (Herbst 1994 bis Herbst 1996). Sie betrachtet die Entwicklung der Antikörperprävalenz in Populationen mit unterschiedlicher Ausgangssituation sowie den Nachweis von KSPV. Weiterhin wird das Wiederauffinden eines mitgeführten Markers untersucht, welcher indirekt Aufschluß über die Herkunft der vorgefundenen Antikörper (Impf- oder Feldvirus) geben sollte.

Während des Feldversuchs tauchten aus der aktuellen Situation heraus Fragen auf, welche einer Abklärung bedurften. Eine der drängendsten Fragen war die nach den Auswirkungen einer o.I. in der Inkubationszeit der Schweinepest bei Infektion mit KSPV unterschiedlicher Virulenz, was möglichen Bedingungen bei einer o.I. im infizierten Gebiet entspricht. Hierzu wurden an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Insel Riems (BFAV) experimentelle Arbeiten durchgeführt, deren Ergebnisse ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sind.

2. Literaturübersicht

2.1. Das Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV)

2.1.1. Taxonomie und morphologische sowie genomische Charakterisierung

Das Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) gehört zusammen mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) und dem Border Disease-Virus (BDV) zur Gattung der Pestiviren aus der Familie der Flaviviridae (Wengler, 1991). Bei den Pestiviren handelt es sich um behüllte Viren mit einem Durchmesser von ca. 40 bis 60 nm, welche ein Kapsid mit wahrscheinlich ikosaedrischer Symmetrie besitzen (Horzinek, 1973). Das Genom der Pestiviren besteht aus einer einsträngigen RNA von positiver Polarität (Diderholm und Dinter, 1966). Sie hat beim KSPV eine Länge von 12,5 kb und weist einen offenen Leserahmen (ORF) auf, der für 3898 Aminosäuren codiert (Collett et al., 1988a; Meyers et al., 1989; Moormann et al., 1990).

Pestiviren sind strukturell und antigenetisch nahe verwandt. Kreuzreaktionen wurden zuerst von Darbyshire (1960) im Agargelpräzipitationstest nachgewiesen. Eine Infektion mit Virus einer Art induziert in unterschiedlichem Maße Antikörper, die auch mit anderen Pestivirus-Arten kreuzreagieren (Moennig und Plagemann, 1992). Nach Dahle et al. (1993) kann eine vorausgegangene BVDV-Infektion Schweine vor dem klinischen Ausbruch der KSP schützen. Sie vermag aber eine Virämie des KSPV nicht zu unterdrücken. Auch Leforban et al. (1992) stellten fest, daß unter bestimmten Umständen der vorherige Kontakt mit ruminanten Pestiviren vor der Erkrankung an Schweinepest schützt.

2.1.2. Genprodukte des KSPV

Der ORF des KSPV codiert die Synthese eines hypothetischen Polyproteins, welches eine co- und posttranslationale Prozessierung in mindestens 11 reife virale Proteine erfährt. Initial spaltet dazu das Nichtstrukturprotein p 23 autoproteolytisch ab, um als Protease wirksam zu werden (Collett et al., 1988a; Stark et al., 1990; Collett et al., 1991; Stark et al., 1993).

Die vier Strukturproteine des KSPV liegen im 5'-terminalen Drittel der Sequenz für das Polyprotein, gefolgt von den Nichtstrukturproteinen. Zu den Strukturproteinen gehören das Nukleokapsidprotein C (p 14) (Thiel et al., 1991) und die drei Glykoproteine der Hülle des Virions, welche mit E^{rns} (gp 44/48), E1 (gp 33) und E2 (gp 55) bezeichnet werden (Collett et

al., 1988a, 1988b; Stark et al., 1990; Moormann et al., 1990; Thiel et al., 1991; Rümenapf et al., 1993).

2.1.3. Antigene Reaktionsmuster

International wurden eine Reihe gegen die Strukturproteine gerichtete monoklonale Antikörper (mAk) hergestellt, von denen die meisten zwischen KSPV- und BVDV-Stämmen unterscheiden können (Wensvoort et al., 1989b; Greiser-Wilke et al., 1990; Weiland et al., 1990; Edwards et al., 1991; Paton et al., 1992; Weiland et al., 1992). Gegen das hauptsächlichste antigene Hüllprotein E2 sowie gegen E^{ms} sind mAk isoliert worden, die neutralisierende Eigenschaften aufweisen (Wensvoort et al., 1986, 1989b; Wensvoort, 1989b; Weiland et al. 1990, 1992).

Mit Hilfe von 13 mAk wurde das Glykoprotein E2 des Stammes Brescia in die vier Domänen A, B, C und D eingeteilt (Wensvoort, 1989b). Die Domänen sind auf zwei strukturellen Antigeneinheiten lokalisiert. Die eine Einheit besteht aus den variablen Domänen B und C, die andere aus der hochkonservierten Domäne A, welche auch innerhalb der Gattung Pestivirus hoch konserviert ist.

Mittels 11 mAk gegen das Hüllprotein E^{ms} und 12 mAk gegen E2 wurden verschiedene Bindungsmuster für KSPV- und auch BVDV-Stämme und -Isolate demonstriert. Dafür wurden 135 Pestivirus-Stämme und -Isolate im Immunperoxidasetest untersucht. Damit gelang die Unterscheidung von 21 Antigentypen bei insgesamt 126 untersuchten KSPV-Stämmen und -Isolaten. Diese mAk können somit Verwendung finden, um die Herkunft des KSPV nach einem Ausbruch der Krankheit aufzudecken (Phänotypisierung). Bei den Untersuchungen zeigte sich, daß die Anti-KSPV-E^{ms}-mAk in der Lage sind, eine größere Variabilität unter den KSPV-Stämmen und -Isolaten zu erkennen als die Anti-KSPV-E2-mAk (Kosmidou, 1995; Kosmidou et al., 1995).

Wensvoort et al. (1989a) beschrieben mAk gegen das gp 42 des C-Vaccine-Stammes der KSP. Edwards et al. (1991) verglichen drei mAk gegen das C-Virus miteinander.

Gegen Nichtstrukturproteine gerichtete mAk wurden von Muyldermans et al. (1993) näher beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung von KSP-Virusisolaten bietet die als Genotypisierung bezeichnete vergleichende Sequenzierung bestimmter Genomabschnitte

(Strebelow et al., 1996; Fritzeimer et al., 1997; Vilček et al, 1997; Strebelow und Kaden, 1998).

2.2. Infektion mit dem Virus der KSP

2.2.1. Pathogenese

Die Klassische Schweinepest ist eine hochkontagiöse Erkrankung, welche Haus- und Wildschweine befällt.

Das Virus der KSP wird durch infizierte Schweine übertragen, die den Erreger u.U. schon einen Tag nach der Infektion ausscheiden. Zunächst sind der Speichel, Nasen-, Augen- und Rachensekret virushaltig, einige Tage später auch Kot und Harn. Eine weitere sehr wichtige Ansteckungsquelle sind virushaltige Schlacht- und Fleischprodukte sowie Küchenabfälle. Gesunde Tiere infizieren sich gewöhnlich auf oronasalem Weg, wobei die erste Virusreplikation in epithelialen Zellen der Tonsillen im Rachenraum stattfindet. Das KSPV gelangt über die Krypten der Tonsillen in das darunterliegende lymphatische Gewebe. Nach dieser ersten Vermehrung gelangt es über die Lymphbahnen in die regionalen Lymphknoten, von wo es nach einer weiteren Replikationsphase ungefähr 16 bis 24 Stunden p.i. in die Blutbahn eindringt und die primären Zielorgane (Milz, Knochenmark, viszerale Lymphknoten und lymphoide Gewebe des Dünndarms) befällt. Durch die Vermehrung in diesen Organen sowie in zirkulierenden Leukozyten und mononukleären Zellen kommt es zu einer Virämie. Erst in der letzten Phase der Virämie werden auch parenchymatöse Organe befallen.

Die Virusvermehrung in den Zellen des blutbildenden Gewebes im Knochenmark und in den Leukozyten verursacht eine Leukopenie. Die typischen petechialen Blutungen bei akuter KSP sind als das Resultat einer direkten Kapillarschädigung durch Virusvermehrung in den Endothelien in Verbindung mit schwerer Thrombozytopenie infolge einer Verbrauchskoagulopathie und Störungen der Fibrinogensynthese anzusehen (Liess, 1987; Trautwein, 1988; Fischer, 1992; Van Oirschot, 1992).

2.2.2. Verlaufsformen der KSP und klinisches Bild

Bei der KSP werden unterschiedliche klinische Erscheinungsformen beobachtet. Dabei handelt es sich um entweder perakute, akute, subakute oder chronische Verläufe (Hanson, 1957; Mengeling und Cheville, 1968). Zudem werden zunehmend inapparente oder atypische

Verlaufsformen beschrieben (Pittler et al., 1968; Liess et al., 1975; Carbrey et al., 1977, Kaden und Lange, 1997). Bei intrauterin infizierten Ferkeln kann eine kongenitale persistierende Infektion mit dem KSPV auftreten (Meyer et al., 1981; Van der Molen und Van Oirschot, 1981a, 1981b).

Die Ausprägung der klinischen Symptome wird von verschiedenen Faktoren abhängig gemacht. So spielen die Virulenz des Stammes oder Isolates, die Infektionsdosis und Wirtsfaktoren wie Alter, immunologisches Reaktionsvermögen und individuelle Unterschiede eine Rolle (Carbrey et al., 1966; Plateau et al., 1980; Liess, 1987; Van Oirschot, 1992; Kaden et al., 1997). Depner et al. (1996) machen für die unterschiedlichen Verlaufsformen der KSP vor allem das Alter des Tieres sowie Kondition und Konstitution, also auch die Rasse verantwortlich und messen der Infektionsdosis sowie der Virulenz des Virusisolates nur eine untergeordnete Bedeutung bei.

Beim perakuten Verlauf der Erkrankung sterben die betroffenen Tiere ohne vorherige spezifische Symptomatik.

Die akute Form der KSP tritt innerhalb von sechs Tagen nach Infektion auf und ist durch eine Temperaturerhöhung von anfänglich über 42°C, später meist zwischen 41°C und 42°C gekennzeichnet. Gleichzeitig kommt es zum Rückgang der Leukozytenzahl im peripheren Blut. Inappetenz, Konjunktivitis, Nasenausfluß, schwere wäßrige Durchfälle nach anfänglicher Verstopfung, Schwäche der Nachhand, Konvulsionen und Blutungen in die Haut sind hier die beherrschenden Symptome. Meist tritt der Tod der Tiere zwischen dem 8. und 20. Tag nach der Infektion ein. Eine entsprechende Beschreibung der klinischen Symptomatik der akut-letalen Form findet sich bei Depner et al. (1996). An gleicher Stelle wird auch über die Beobachtung einer akut-transienten Form berichtet, bei welcher die Tiere nach mildem klinischen Verlauf gesunden und Antikörper ausbilden.

Die chronische Form ist charakterisiert durch intermittierende Phasen von Anorexie, Fieber, Leukopenie, Diarrhoe und Dermatitis. Es sind vermehrt Kümmerer zu beobachten. Sekundärinfektionen sind häufig bei chronischer KSP. Hervorgerufen wird diese Art der Erkrankung durch in ihrer Virulenz abgeschwächte Erreger. Chronische Krankheitsverläufe wurden sowohl unter natürlichen als auch experimentellen Bedingungen beobachtet (Cheville und Mengeling, 1969; Mengeling und Packer, 1969; Depner et al., 1996).

Eine kongenitale persistierende Form kann bei intrauteriner Infektion mit dem KSPV entstehen. Je nach dem Infektionszeitpunkt in der Trächtigkeit kann eine pränatale Infektion

zum Fruchttod mit anschließender Mumifikation oder Todgeburten, Mißbildungen, Geburt lebensschwacher Ferkel, angeborenem Tremor oder auch zur Geburt scheinbar gesunder Ferkel führen, welche an der Spätform der KSP erkranken. Die betroffenen Tiere kümmern, entwickeln eine Leukopenie und sterben Wochen bis Monate nach der Geburt (Van Oirschot, 1979a, 1979b; Meyer et al., 1981; Depner et al., 1996).

Die persistierende Infektion geht mit einer ständigen Ausscheidung von Virus einher. Charakteristisch für diese Verlaufsform ist die Immuntoleranz der Tiere gegenüber KSPV, so daß Antikörper gegen das Virus zu keinem Zeitpunkt gebildet werden. Van Oirschot (1979a, 1979b) fand nach experimenteller Infektion tragender Sauen mit KSPV, daß die persistent infizierten Ferkel keine humorale Immunantwort auf KSPV zeigten, aber normale Antikörperentwicklung gegen nicht verwandte Antigene stattfand. Lymphozyten der betroffenen Tiere reagierten auf Stimulierung vergleichbar oder nur geringfügig vermindert wie die von gesunden Kontrolltieren.

Die Erkrankung des Schwarzwildes an KSP verläuft prinzipiell nicht anders als die des Hausschweines (Kaden, 1998a). In der freien Natur fallen vor allem zentralnervöse Störungen auf. Diese machen sich in Verhaltensauffälligkeiten wie Kontaktsuche und taumelndem, schwankenden Gang bemerkbar. Weiterhin werden bei infizierten Tieren häufig ein aufgekrümmter Rücken, struppiges, glanzloses Haarkleid und Abmagerung festgestellt. Jungtiere erkranken stärker als Alttiere. Die pathologischen Befunde gleichen denen beim Hausschwein (Loepelmann und Dedek, 1987; Depner et al., 1997).

Wildschweine zeigten in verschiedenen Studien die gleiche Empfänglichkeit für das Virus wie Hausschweine. Sie scheinen daher auch kein besseres Virusreservoir darzustellen als diese. Ebenso wie bei Hausschweinen kann es auch beim Wildschwein unter den Bedingungen der intrauterinen Infektion zu einer kongenitalen persistierenden Infektion mit Virämie und Immuntoleranz kommen. Auf diese Weise kann sich eine KSP-Epidemie in einer Population selbst erhalten. Maternale Antikörper können bei gesunden Tieren mitunter bis zu 12 Monate vorhanden sein (Depner et al., 1997).

Depner et al. (1995) konnten bei experimenteller Infektion zweier Frischlinge keine Unterschiede im Erkrankungsverlauf gegenüber mit dem gleichen Isolat infizierten Absatzferkeln feststellen. Sowohl Haus- als auch Wildschweine reagierten mit der akuten Form der Schweinepest. Diese äußerte sich mit Hautblutungen und nervösen Symptomen. Bei hämatologischen Untersuchungen wurden Leukopenie, Lymphopenie und Thrombozytopenie

beobachtet. Bei einer mit dem gleichen Isolat infizierten tragenden Bache (Depner et al., 1995) wurden keine klinischen Symptome, aber ein ansteigender Antikörpertiter gegen KSPV vorgefunden. Von den 6 Frischlingen erwies sich ein Tier als virämisch und immuntolerant gegenüber KSPV. Dieses Tier kümmerete und verendete 39 Tage nach der Geburt. Postmortal wurde eine Lymphozytenverarmung des Thymus und peripherer lymphoider Organe verbunden mit Nekrose vorgefunden.

2.2.3. Pathologie

Bei akuter Schweinepest findet man das Bild einer septikämischen Erkrankung mit Hämorrhagien besonders in den Lymphknoten und Nieren. Milzinfarkte sind als fast pathognomonisch anzusehen. In den kleinen Blutgefäßen sind Mikrothromben als Ausdruck der disseminierten intravasalen Koagulation sowie eine Degeneration der Endothelzellen anzutreffen. Entzündliche Reaktionen treten auch im Respirations-, Digestions- und Urogenitaltrakt auf. Oftmals wird auch eine Enzephalitis beobachtet (Dunne, 1975; Trautwein, 1988). Nekrosen des lymphoiden Gewebes (Buttons im Caecum und Colon) werden häufig bei subakuter und chronischer KSP gesehen. Diese klassischen pathologischen Befunde sind allerdings nicht immer zu finden. In Abhängigkeit von der Virulenz des Stammes oder Isolates gibt es eine große Variabilität in der Art und Schwere der Organläsionen (Carbrey et al., 1966; Pittler et al., 1968; Kamijo et al., 1977; Plateau et al., 1980; Trautwein, 1988; Gruber et al., 1995).

Bei kongenitaler persistierender Infektion mit KSPV treten vor allem pathomorphologische Veränderungen im lymphatischen Gewebe auf, welches eine Verarmung an Lymphozyten zeigt. Nach Studien von Van der Molen und Van Oirschot (1981a, 1981b) sind die Follikel in Milz und Lymphknoten (B-Zell-abhängige Gebiete) regelmäßig schwerer geschädigt als die Thymus-(T-Zell-)abhängigen Gebiete. Hochgradige Atrophie des Thymus konnte bei allen untersuchten Tieren nachgewiesen werden. Ebenfalls betroffen waren die Peyerschen Platten im Ileum, wo die Follikel in Größe und Anzahl vermindert waren. Weiterhin wurden pathomorphologische Läsionen der Mesangiumzellen, der Glomeruli und des Endothels der Nieren, eine Zottenatrophie im Dünndarm, Nekrosen und Ulzerationen im Dickdarm sowie Entzündungen an Endothel und Epithel des Respirationstraktes vorgefunden. Eine Hyperplasie der Nebennierenrinde wird als Zeichen einer erhöhten Produktion von Glucocorticoiden angesehen, womit zumindest teilweise die schweren Zerstörungen des

lymphatischen Gewebes erklärt werden können. Gefäßschäden, besonders Degeneration des Endothels, wurden zwar regelmäßig beobachtet, führten aber nicht zu Hämorrhagien und Infarkten. Am Zentralnervensystem wurde im Gegensatz zur akuten Schweinepest niemals eine Meningoenzephalitis, dafür aber Atrophie und chronische Neuronendegeneration durch erhöhten intrakraniellen Druck infolge einer Plexitis festgestellt. Die Mechanismen der Entstehung der beschriebenen Läsionen bleiben im Unklaren.

2.2.4. Immunologie

Sowohl zelluläre als auch humorale Immunmechanismen spielen bei der Immunitätsbildung gegen KSPV eine Rolle. Die Immunitätsbildung ist jedoch mehr als bei anderen Virusinfektionen von beeinflussenden Faktoren wie antigenen und immunologischen Eigenschaften des Virus, Alter und Resistenzlage der Tiere abhängig. Nach Mayr et al. (1984) erscheinen bei Infektion mit vollvirulentem Virus neutralisierende Antikörper zwischen dem 7. und 12. Tag und erreichen ihren Gipfel drei bis vier Wochen nach der Infektion, wohingegen bei Infektion mit schwachvirulentem Virus Antikörper erst 7 bis 24 Tage nach der Infektion detektierbar sind. Van Oirschot (1994) gibt für das Auftreten von KSPV-spezifischen Antikörpern 10 bis 21 Tage nach Infektion an. Urbaneck (1987) verweist auf einen frühen Nachweis von IgM mit neutralisierendem Effekt in der akuten Krankheitsphase ab dem 7. Tag. Ab der 3. Woche ist dann das IgG vorherrschend. Nach natürlicher Infektion persistieren neutralisierende Antikörper bei schwachvirulentem Virus über ein Jahr, bei vollvirulentem Virus mehrere Jahre, wahrscheinlich lebenslang (Mayr et al., 1984). Bei chronisch infizierten Tieren können neutralisierende Antikörper völlig ausbleiben, die Immunantwort kann verzögert sein oder nur zeitweise detektierbar (Van Oirschot, 1994).

Schweine mit einer kongenitalen persistierenden Infektion verharren im Stadium der Immuntoleranz gegenüber KSPV bis zu ihrem Tode; sie entwickeln niemals Antikörper gegen das Virus, scheiden es aber zeitlebens aus (Van Oirschot, 1979a, 1979b; Meyer et al., 1981; Depner et al., 1996).

Maternale Antikörper werden von immunen Sauen während der ersten 36 bis 48 Stunden nach der Geburt übertragen, wobei die höchsten Titer im Kolostrum nach 24 bis 28 Stunden erreicht werden. Die Ferkel sind damit 5 bis 8 Wochen vor der Erkrankung, aber nicht vor einer Replikation und Ausscheidung des KSPV geschützt (Terpstra, 1977; Mayr et al., 1984; Van Oirschot, 1994).

Nach experimenteller Infektion von Saugferkeln konnten Depner et al. (1994) die Entwicklung neutralisierender Antikörper bei allen Tieren beobachten. Der früheste Zeitpunkt ihres Auftretens lag 14 d p.i. Die Immunantwort war bei den neun von zehn Tieren, die später an der Infektion starben, ausgesprochen schwach und oft nur im Neutralisationstest mit dem homologen Virus nachweisbar. Ein Tier überlebte die akute Infektion und reagierte mit stark steigendem Antikörpertiter nach dem 30. d p.i.

Narita et al. (1996) fanden bei der chronischen Form der KSP eine signifikante Erhöhung der T-Lymphozyten, wobei ihre Lokalisation mit dem Replikationsort des Virus identisch war.

Šuša et al. (1992) beobachteten die Anzahl der B-Lymphozyten bei akuter Schweinepest. Dabei konnte eine Abnahme der B-Zellen im Endstadium der Erkrankung sowohl im peripheren Blut als auch in Milz und Lymphknoten festgestellt werden. Diese Abnahme wird auf die Replikation des KSPV in B-Lymphozyten aller Reifestadien in den Follikeln oder eine Zerstörung der B-Zellen durch Zytokine infizierter Gewebe zurückgeführt. Ferner wurde eine allgemeine Leukopenie ermittelt, wobei die stabkernigen neutrophilen Granulozyten in ihrer Anzahl zunahmen, während alle anderen Populationen abnahmen.

2.3. Verbreitung und derzeitiges Auftreten der KSP

2.3.1. Hausschwein

Die KSP ist bei Haus- und Wildschweinen regional unterschiedlich verbreitet. Einige der am stärksten betroffenen Länder im Zeitraum von 1993 bis 1997 waren Rußland, Indien, China und Brasilien. Frei von KSP sind derzeit u.a. die USA, Kanada, Australien und die skandinavischen Länder (Valder, 1997).

In Europa stellt sich die Situation folgendermaßen dar: Nach einer großen Zahl von Ausbrüchen der Erkrankung im Jahr 1990, welche vor allem Österreich, Deutschland, Belgien und Italien, aber auch Frankreich und die Niederlande betrafen, trat die KSP in den folgenden beiden Jahren nur vereinzelt auf. In Italien blieb die Anzahl der Ausbrüche in diesem Zeitraum allerdings konstant. 1993 kam es zu einem starken Anstieg der Fälle besonders in Deutschland. Im folgenden Jahr konzentrierte sich das Geschehen außer auf Deutschland auch auf Belgien und Italien. 1995 sank die Zahl der Ausbrüche in Deutschland, blieb aber immer noch auf hohem Niveau, wohingegen sich die Fälle in Italien verdoppelten (Westergaard, 1996). Nach Valder (1997) war eine große Zahl von Schweinepest-Fällen bis Mitte 1997 in den Niederlanden zu verzeichnen.

Tab. 1: Anzahl der Ausbrüche von KSP in den EU-Mitgliedsstaaten bei Hausschweinen. Aus: Westergaard, 1996; Kaden, 1998b; EU-Tierseuchenstatistik

Land	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Österreich	127	10	23	1	1	1			0
Belgien	113	0	0	7	48	0			0
Frankreich	4	1	1	1	0	0			0
Deutschland	118	6	13	100	117	54	4	46	11
Italien	15	15	20	12	24	42			15
Niederlande	2	0	5	0	0	0			5
Spanien									21

Die Seuchenausbrüche der Jahre 1993/94 betrafen vor allem die Länder Niedersachsen und Mecklenburg-Vorpommern, aber auch Bayern, Rheinland-Pfalz, Nordrhein-Westfalen, Baden-Württemberg, Schleswig-Holstein und Sachsen. Drei verschiedene, auf der Grundlage der Phänotypisierung mit mAk ermittelte Virusstämme sind für dieses Seuchengeschehen verantwortlich zu machen, welche in jeweils bestimmten Regionen Deutschlands vorwiegend vertreten sind. So wurde in Niedersachsen der Virustyp Lothringen '92 identifiziert, während in Mecklenburg-Vorpommern die Seuche durch den Typ Flandern '90 bestimmt wird. Der Typ Schweinfurt '93 wurde vorrangig in Bayern gefunden. Ende 1996 sowie in den ersten Monaten des Jahres 1997 traten in Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen bzw. Thüringen noch drei weitere Virustypen auf (Pittler et al., 1995; Fiedler, 1997; Schlüter et al., 1997).

2.3.2. Wildschwein

Neben dem Hausschwein ist auch das Wildschwein die natürliche Wirtsspezies des KSPV. Infektionen von Wildschweinen mit KSPV wurden in den vergangenen Jahren in Osteuropa und innerhalb der EU in Deutschland, Frankreich, Italien und Österreich festgestellt.

In Deutschland waren zuerst (1989 bis 1991) Gebiete von Hessen betroffen. 1990 hatte sich die Schweinepest auf angrenzende Regionen von Rheinland-Pfalz ausgedehnt. Im Jahre 1992 (bis 1995) wurde die Seuche bei Schwarzwild in Niedersachsen, im Jahr darauf in Mecklenburg-Vorpommern diagnostiziert, wo sie heute noch verbreitet ist. Von 1992 bis 1995 waren auch Gegenden von Rheinland-Pfalz, welche an Frankreich grenzen, von Schweinepest betroffen. Seit 1995 ist die Wildschweinpopulation in Teilen Brandenburgs infiziert. 1996

wurde erneut Wildschweinepest in Niedersachsen festgestellt. Die meisten Ausbrüche waren in den Jahren 1993 mit 289 und 1994 mit 812 Fällen zu verzeichnen, danach gingen sie auf 150 bis 200 pro Jahr zurück (Westergaard, 1996; Kaden, 1998a, 1998b).

Die beim Schwarzwild gefundenen Virusstämme waren jeweils identisch mit den bei Seuchenausbrüchen beim Hausschwein identifizierten. In Niedersachsen und Rheinland-Pfalz handelte es sich dabei um den Typ Lothringen '92. In Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg wurde bei den meisten Ausbrüchen der Typ Flandern '90 gefunden. Der Erkrankungsverlauf kann aber unabhängig vom Virustyp verschieden sein. In Brandenburg dominiert nach wie vor die akute Form der KSP, während in Mecklenburg-Vorpommern neben dem klassischen auch ein protrahiertes bzw. subklinisches Geschehen zu beobachten ist (Pittler et al., 1995; Letz, 1997; Kaden, 1998b).

Gemäß molekularbiologischer Charakterisierung der KSPV-Isolate treten beim Schwarzwild zur Zeit die Virussubtypen „Uelzen“ (Lothringen '92) sowie „Güstrow“ und „Rostock“ (beides Flandern '90) auf (Fritzemeier et al., 1997; Strebelow und Kaden, 1998).

2.4. Biologie des Schwarzwildes und dessen Rolle im KSP-Geschehen

2.4.1. Biologie des Schwarzwildes

Die Grundlage für das nachfolgende Kapitel bildet der „Schwarzwild-Report“ von Meynhardt (1982).

Da auch in der vorliegenden Arbeit Begriffe aus der Jägersprache verwendet werden, sollen hier einige von diesen, das Schwarzwild betreffende, erklärt werden. Wildschweine werden weidmännisch als Sauen bezeichnet, ihre Jungtiere im ersten Lebensjahr als Frischlinge, im zweiten als Überläufer. Ab dem dritten Lebensjahr wird von Keiler (männlich) oder Bache (weiblich) gesprochen.

2.4.1.1. Revier und Rotte

Wildschweine benötigen kein besonderes Biotop, sondern lediglich genügend Deckung und Nahrung sowie kleine Tümpel oder sumpfige Plätze zur Körperpflege. Wildschweine sind sehr reviertreu und behalten oft über Jahre ihre Einstandsgebiete. Auch bei Störungen, wie sie z.B. eine Drückjagd darstellt, wird das Revier i.d.R. nicht gewechselt, sondern im Gegenteil möglichst schnell in den gewohnten Einstand zurückgekehrt. Auch finden sich bei solchen

Ereignissen auseinandergesprengte Rotten recht schnell wieder zusammen. Nur bei ständiger Unruhe oder Verlust der Lebensbedingungen wird das Revier gewechselt.

Die Lebensgemeinschaft des weiblichen Schwarzwildes und ihrer Nachkommen ist die Rotte. Rotten sind immer Familienverbände, d.h. die Mitglieder einer Rotte Sauen sind grundsätzlich miteinander verwandt. Die Bildung einer Rotte kann von einem einzelnen weiblichen Tier oder einem ganzen Wurf weiblicher Stücke ausgehen. Männliche Tiere scheiden für die Rottenbildung aus. Überläuferkeiler werden spätestens mit 18 Monaten aus dem Familienverband von den Bachen ausgestoßen. Danach bleiben sie noch einige Monate in lockeren Keilergemeinschaften zusammen, bis sie zu Beginn der nächsten Rauschzeit endgültig Einzelgänger werden. Diese Keiler haben kein festes Einstandsgebiet mehr, wandern über z.T. weite Strecken umher und leben sehr vorsichtig und zurückgezogen. Sie leben nur während der Rauschzeit für einige Wochen bei einer Rotte. Verletzte und kranke Tiere werden aus dem Rottenverband ausgestoßen. Rotten teilen sich, wenn sie eine bestimmte Stärke (maximal 30 Mitglieder) überschritten haben. Eine ungünstige Position in der Rangfolge kann ebenfalls dazu führen, daß einzelne Sauen ohne vorherige Kämpfe die Rotte verlassen und einen neuen Familienverband gründen. Ein weiterer Grund für eine Teilung kann Nahrungsmangel im Revier sein.

Die Aktivitätsperiodik des Schwarzwildes hat sich in Anpassung an die Lebensbedingungen in einer Kulturlandschaft so verändert, daß aus dem ehemals tagaktiven ein nachtaktives Tier geworden ist. Eine wenig gestörte Rotte geht allerdings immer mehr zur Tagaktivität über und ist dadurch auch leichter zu bewirtschaften. Es ist ein ziemlich genauer Rhythmus zwischen Ruhe- und Bewegungsphasen zu beobachten. Weiterhin ist der Aktivitätsverlauf auch von der Jahreszeit und plötzlich wechselnden Witterungseinflüssen abhängig. Der Ort, den sich das Schwarzwild für seine Schlafkessel auswählt, wechselt häufig und je nach Wetterlage. Luftige und schattige Bestände werden an heißen Tagen, dichte Baumbestände an nassen und kalten Tage bevorzugt. Zwischen den Schlafkesseln halten die Sauen grundsätzlich eine Distanz von ca. 4 bis 5 Metern ein. Im Revier werden bestimmte Kot- und Harnplätze angelegt, die eine wichtige Funktion in der Reviermarkierung spielen. Malbäume haben die gleiche Aufgabe und tragen außerdem zum Wohlbehagen der Sauen bei, die sich an ihnen scheuern. Der Zweck der Suhle und der daraus resultierenden schlammig-feuchten Schwarte scheint einerseits Kühlung an heißen Tagen, andererseits Fernhalten von Fliegen und Stechinsekten von der Schwarte zu sein.

2.4.1.2. Nahrung

Die Nahrung der Sauen setzt sich aus unterirdischer pflanzlicher Nahrung wie Wurzeln, Knollen und Zwiebeln, aus grünen Pflanzenteilen, Früchten, Beeren und Getreide sowie tierischer Nahrung zusammen. In Gegenden mit intensiver Land- und Forstwirtschaft besteht die Nahrung zu 49% aus Waldfrüchten (Eicheln, Bucheckern), zu 22% aus Getreide und Hülsenfrüchten, zu 21% aus unterirdischer pflanzlicher Nahrung (fast ausschließlich Kartoffeln) und nur zu je 4 % aus grünen Pflanzenteilen und tierischer Nahrung. Tierische Nahrung besteht zum großen Teil aus Resten von erlegtem Wild oder Fallwild und zum geringeren Teil aus Kleinsäugern, Regenwürmern und Larven. Meynhardt beobachtete, daß Eicheln jeder anderen Nahrung, auch Mais, vorgezogen werden. An zweiter Stelle folgt tierische Nahrung, wobei Wildschweine auch verendete Stücke der eigenen Art, niemals jedoch Familienmitglieder aufnehmen. Auf jeden Fall ist das Schwarzwild in seiner Ernährung sehr anpassungsfähig und kann sich leicht auf veränderte Bedingungen einstellen, indem es z.B. bei langer Trockenheit auf die erhöhte Aufnahme grüner Pflanzenteile ausweicht. Auch beim Auftreten von Schädlingen wie Raupen werden diese massenhaft verspeist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in der heutigen Kulturlandschaft das Schwarzwild eine wichtige Rolle im biologischen Gleichgewicht der Natur spielt.

2.4.1.3. Rangordnung und Sozialverhalten

Innerhalb einer Rotte besteht eine feste soziale Rangordnung, jedes Tier hat einen bestimmten Platz in der Gemeinschaft. Dies läßt sich am besten während der Futteraufnahme feststellen, und somit hat dieser Aspekt auch entscheidende Bedeutung für eine Köderung des Schwarzwildes. Ausschlaggebend für die Rangstellung eines Tieres ist vor allem sein Alter, unabhängig von der Körpermasse. Älteren Tieren wird der Fraß stets bereitwillig überlassen. Bei Tieren einer Altersstufe wird der Rang ausgekämpft, und die Körpermasse spielt hier die entscheidende Rolle. Die Rangordnung kann sich nur innerhalb der einzelnen Altersgruppen verschieben, was z. B. bei Krankheit oder Verletzung geschieht. Die Festlegung der Rangordnung beginnt bei den Frischlingen erst in der 4. Lebenswoche. So gibt es bis dahin auch keine Saugordnung, jeder Frischling saugt da, wo er gerade eine Zitze erwischt, und sei es bei einer fremden Bache. Innerhalb weniger Tage wird dann aber durch Beißereien um die Zitzen die Saugordnung geregelt, und jeder Frischling saugt nur noch bei seiner Mutter an

seiner Zitze. Verwaiste Frischlinge der eigenen Rotte werden von anderen führenden Bachen angenommen und genauso behandelt wie der eigene Nachwuchs. Dabei kann es natürlich Probleme wegen der Zitzenzahl geben, und die fremden Frischlinge müssen sich oft mit dem begnügen, was übrigbleibt. In den ersten vier Lebensmonaten sind Frischlinge noch nicht in die Rangordnung einbezogen, sie kämpfen in dieser Zeit nur untereinander spielerisch die Ränge aus. Sie scheiden auch bei der Aufnahme des Fraßes grundsätzlich aus der Rangordnung aus, auch nichtführende Stücke dulden sie dabei neben sich. Nach 4 ½ Monaten werden sie von der Muttermilch abgesetzt, und die führenden Bachen dulden von da an nur ihre eigenen Frischlinge bei der Futteraufnahme in der Nähe. Die Nachkommen von ranghohen Bachen haben hiermit einen entscheidenden Vorteil. Ab dem Alter von 7 bis 8 Monaten müssen sich die Frischlinge in der Rotte nach Rängen einordnen, welche im 10. Lebensmonat genau festliegen. Zwei bis drei Monate später werden diese allerdings so verändert, daß jetzt alle männlichen Überläufer an niedrigster Stelle liegen, wobei die größere Körpermasse gegenüber den Bachen keine Rolle spielt. Im Alter von etwa 18 Monaten verlassen die männlichen Wildschweine die Rotte schließlich ganz. Bis zur darauffolgenden Rauschzeit bilden die Keiler noch lockere Gemeinschaften, in denen auch eine Rangordnung herrscht.

Eine Besonderheit stellt die Situation am Wurfkessel dar. Selbst das rangniedrigste weibliche Stück scheut sich dort nicht, ranghöhere Rottenmitglieder anzugreifen und zu vertreiben.

Die Rangordnung zwischen einzelnen Rotten ist abhängig vom Territorium, auf welchem sie sich begegnen. Nichtrevieransässige Rotten stehen grundsätzlich niedriger im Rang als die Revierbesitzer und werden kompromißlos verjagt.

Sauen nutzen einen großen Teil ihrer Aktivitätszeit zur sozialen Körperpflege. Der Drang zum Putzen nimmt mit dem Alter des Stückes zu. Auch Frischlinge putzen sich schon gegenseitig, und die Mütter lassen sich von ihrem Nachwuchs pflegen. Dieses Verhalten läßt aber im Alter von einem Jahr nach und verstärkt sich erst wieder nach dem 2. Lebensjahr.

Sämtliche Aktivitäten werden von der gesamten Rotte gemeinsam ausgeführt, z.B. die Nahrungsaufnahme oder der Saugakt bei den Frischlingen, das Putzverhalten und das Schlafen. Für das Erkennen einer Gefahr sind alle Rottenmitglieder verantwortlich, auch die Frischlinge. Schließt sich ein Tier aus dieser Gemeinschaft aus, so ist dies immer ein Hinweis auf eine Erkrankung oder Verletzung.

2.4.1.5. Fortpflanzung

Die Fortpflanzungszeit (Rauschzeit) der Wildschweine konzentriert sich vor allem auf die Monate November, Dezember und Januar. Der Brunftzyklus des Wildschweines dauert 21 bis 23 Tage, der Östrus 2 Tage. Das ranghöchste Tier der Familie scheint der Auslöser für den Beginn der Brünftigkeit zu sein. Danach werden alle Bachen des Familienverbandes innerhalb weniger Tage rauschig und beschlagen. Die Rauschtermine zwischen den Rotten können mehrere Wochen auseinanderliegen. Etwa 14 Tage vor der Rausche beginnen die Bachen Markierungen an den Malbäumen zu setzen, die den im Revier lebenden Keilern die bevorstehende Aufnahmebereitschaft signalisieren sollen. Fehlt einer Rotte die Führungsbache, z. B. durch deren Abschluß im Herbst, so verschiebt sich der Beginn der Rauschzeit zeitlich nach hinten. Es ist möglich, daß Bachen während der Rausche von mehreren Keilern beschlagen werden.

Die Tragzeit beträgt 112 bis 120 Tage. Meynhardt konnte Tragzeiten zwischen 114 und 118 Tagen beobachten, wobei die mittlere Tragzeit 115,5 Tage betrug. Die Tragzeit ist dabei von der Anzahl der Feten abhängig, wobei die Bachen mit der höchsten Fetenzahl die kürzesten Tragzeiten aufweisen. Bachen mit einer Tragzeit von 115 oder 116 Tagen hatten Würfe von 6 bis 8 Frischlingen. In harten Wintern fällt eine Verlängerung der Tragzeit auf 121 Tage wegen des verlängerten Entwicklungsstadiums der Feten auf, wobei auch die Geburtsgewichte der Frischlinge extrem niedrig sein können. Die Zahl der Frischlinge pro Bache schwankt zwischen eins und zehn. Nach achtjähriger Beobachtung errechnete Meynhardt einen Durchschnitt von 5,45 Frischlingen je Wurf, wobei Frischlingsbachen die wenigsten und Altbachen die meisten Feten aufweisen. In der Regel bleiben davon nur zwei Jungtiere pro Bache übrig. Zum Frischen entfernen sich die Bachen einschließlich ihrer vorjährigen Frischlinge von der Rotte. An günstiger Stelle bauen sie sich aus trockenem Unterwuchs einen Wurfkessel. Das Geburtsgewicht liegt in der Regel zwischen 750 und 1200 g. Die neugeborenen Frischlinge verbleiben je nach Witterung einige Tage bis Wochen im Wurfkessel. Danach finden sich alle Bachen eines Familienverbandes am Kessel der ranghöchsten Bache wieder zusammen und bauen neue Kessel in allernächster Nähe zueinander. Für den Nachwuchs fühlen sich immer alle Muttertiere einer Rotte verantwortlich. In den ersten drei Lebenswochen saugen die Frischlinge an einer beliebigen Zitze, auch bei fremden Bachen. Danach erst bildet sich eine Saugordnung. Mit 10 bis 14 Tagen beginnen die Frischlinge, feste Nahrung aufzunehmen. Das Absetzen von der Muttermilch geschieht aber

erst zwischen dem 3. und 4. Lebensmonat. Verlieren Bachen frühzeitig ihre gesamten Frischlinge, so kommt es bei ihnen zu einer Nachrausche, und sie frischen verspätet noch einmal. Dieser Geburtenrhythmus wird danach häufig beibehalten.

2.4.2. Epidemiologische Rolle des Schwarzwildes

Die Rolle des Schwarzwildes im Seuchengeschehen der KSP wird dadurch unterstrichen, daß nach einer Analyse 46% der Erstausrüche in Hausschweinebeständen auf direkte oder indirekte Kontakte mit Schwarzwild zurückzuführen sind (Teuffert et al., 1997; Fiedler, 1997). Da bisher keine Anhaltspunkte dafür gefunden wurden, daß die Schwarzwildbestände in Deutschland enzootisch mit KSPV infiziert sind, muß bei jedem Seuchengeschehen nach einer Einschleppungsursache von außen gesucht werden. Für die Übertragung der Infektion auf das Wildschwein spielen infizierte Speiseabfälle, z.B. von Mülldeponien oder Campingplätzen, offenbar eine große Rolle. Für die anschließende Verbreitung und Aufrechterhaltung der Infektion innerhalb der Schwarzwildpopulation sind vor allem das Sozialverhalten, die Bestandsdichte und die Bejagung des Schwarzwildes sowie die Problematik der Viruspersistenz bei Frischlingen von besonderer Bedeutung (Depner et al., 1998; Kaden, 1998a).

Die Übertragung des KSPV von Wildschweinen auf Hausschweine kann auf verschiedene Weise erfolgen. Infizierte Tiere scheiden das Virus über alle Se- und Exkrete aus. Neben der Verfütterung von Speiseabfällen, die von infizierten Wildschweinen stammen, kann auch die Verfütterung von Grünfütter u.ä. von Feldern, die von schweinepestinfiziertem Schwarzwild begangen werden, eine Rolle spielen. Die Freilandhaltung von Hausschweinen birgt in Gebieten mit KSP beim Schwarzwild ebenfalls ein erhöhtes Infektionsrisiko. Weiterhin können Personen, die sowohl z.B. über die Jagd Kontakt zu Wildschweinen als auch zu Hausschweinebeständen haben, das Virus einschleppen (Kaden et al., 1992; Depner et al., 1995, 1997; Krassnig et al., 1995; Kaden, 1998a, 1998b).

2.5. Bekämpfung der KSP

2.5.1. Grundlagen der Tierseuchenbekämpfung

Die Bekämpfung der Schweinepest erfolgt auf der Grundlage der Richtlinie 80/217/EWG. Die Änderung dieser Richtlinie durch die Richtlinie 91/685/EWG (umgesetzt in der

Schweinepest-Verordnung vom 21. Oktober 1994) beinhaltet ein generelles Impfverbot gegen Schweinepest. Dieses wird mit der Befürchtung von Handelsbeschränkungen in Länder wie die USA oder Japan begründet, welche frei von KSP sind bzw. nicht dagegen immunisieren. Nach Immunisierung mit den derzeitigen Impfstoffen können die dadurch induzierten Antikörper nicht von solchen durch natürliche Infektion erworbenen unterschieden werden. Weiterhin wird befürchtet, daß es durch geimpfte Tiere zu einer unerkannten Verbreitung von Virus kommen kann (Pittler et al., 1995).

Maßnahmen bei Ausbruch der Schweinepest, wie die Festlegung des Sperrbezirks und des Beobachtungsgebietes und die daraus resultierenden Beschränkungen, sind nach §11 der Verordnung geregelt.

Laut Artikel 14 der Richtlinie 80/217/EWG haben EU-Mitgliedsstaaten in Ausnahmefällen die Möglichkeit, die Impfung von Schweinen in begrenzten Gebieten durchzuführen. Eine solche Notimpfung wird in der Schweinepest-Verordnung durch den §13 geregelt. Diese Maßnahme muß durch den Ständigen Veterinärausschuß in Brüssel genehmigt werden. Im Falle des Seuchenzuges 1993/94 wurden die entsprechenden Anträge Deutschlands allerdings immer abgelehnt, was zu den hohen Verlusten in der Schweinehaltung führte (Pittler et al., 1995).

Die Bekämpfungstrategie der Schweinepest beim Schwarzwild zeichnet sich durch einige Besonderheiten aus, welche sich in der Durchführung oft als nicht ganz problemlos erweisen. Der Bekämpfung liegen der Artikel 6a der Änderungsrichtlinie 91/695/EWG und §14a der Schweinepest-Verordnung zugrunde. Nach Feststellung der Seuche bei einem Wildschwein wird um dessen Fund- oder Abschußstelle ein „Wildschweinpest-Gefährdeter Bezirk“ gebildet. In diesem Gebiet werden intensive diagnostische und epidemiologische Untersuchungen durchgeführt und gestreckte, virologisch positive oder verendete Wildschweine unschädlich beseitigt. Da Sperrmaßnahmen bei Wildtieren nicht durchführbar sind, erlangt die Absicherung der Hausschweinebestände in diesem Gebiet durch veterinärhygienische Schutzmaßnahmen eine besondere Bedeutung. Weiterhin wird schnellstmöglich eine Verringerung der Schwarzwildpopulation durch konsequente Bejagung, u.U. auch mit Aufhebung der Schonzeiten, angestrebt. Dadurch kann der Infektionsdruck gemindert und somit das Abreißen der Infektionskette erreicht werden. Auf die Bedeutung einer effektiven Bestandsreduzierung für die Bekämpfung der KSP weist Kaden (1998a, 1998b) hin. Eine zu hohe Bestandsdichte, wie sie in vielen Bundesländern zu verzeichnen ist,

leistet der Infektionsverbreitung Vorschub, da zwischen den einzelnen Rotten zwangsläufig öfter Kontakte stattfinden. In diesem Zusammenhang sind auch vermehrt Kurrungen in die Kritik geraten, die von mehreren Rotten aufgesucht werden (Loepelmann und Dedek, 1987). Bei der Jagd sind seuchenhygienische Aspekte zu beachten, und es darf vor allem nicht zur Versprengung oder ungeordneten Bewegung von Rotten kommen. Eine konsequente Bejagung scheitert oft an der unzureichenden Mitarbeit der Jäger. So werden behördliche Abschußanordnungen nicht eingehalten bzw. der Abschuß erfolgt fehlerhaft (Strecken der Führungsbache), so daß sich die Seuche durch Auflösen von Rottenverbänden und Versprengung einzelner Tiere weiter verbreiten kann (Hillmann und Kaden, 1994; Kaden, 1995, 1996; Kaden und Lange, 1997). Rutili et al. (1998) empfehlen aus diesen Gründen sogar ein Jagdverbot im infizierten Gebiet, dagegen aber eine verstärkte Bejagung der Schwarzwildpopulationen in dessen Umgebung.

Die bei der Bekämpfung auftretenden Probleme sind somit vielfältiger Natur. Ferner kommt hinzu, daß die Erkrankung klinisch lange Zeit unauffällig bleiben kann, z.B. wenn es sich um „atypische“ Formen handelt oder Abweichungen vom Normalverhalten von den Jägern nicht richtig gedeutet werden. Zudem ziehen sich Wildtiere bei fieberhaften Erkrankungen oftmals in feuchte, schwer zugängliche Gebiete zurück, was sowohl die Beobachtung als auch das Auffinden der Kadaver behindert (Loepelmann und Dedek, 1987).

2.5.2. Immunisierungsmaßnahmen

2.5.2.1. Hausschwein

Nachdem zuerst Impfstoffe aus inaktiviertem Virus ihre Anwendung in der Bekämpfung der KSP fanden, haben sich in jüngerer Vergangenheit beim Hausschwein in Europa Lebendimpfstoffe aus attenuierten KSPV-Stämmen bewährt (Mayr et al., 1984). Deren Einsatz geht auf Befunde von Baker (1946) und Koprowski et al. (1946, 1951) zurück, die nachweisen konnten, daß sich KSPV an Kaninchen adaptieren läßt. Attenuierte Lebendimpfstoffe auf der Basis des sogenannten „C“ (China)-Stammes bildeten die Grundlage für den Vakzineinsatz in Deutschland (Urbanek, 1971; Beer et al., 1978). International wurde dieser lapinisierte C-Stamm später an Nierenzellkulturen von Kaninchen und Schaf adaptiert und kommerziell in fetalen Schweine- oder Schafzellen produziert. In der Riemser Vakzine, die die Grundlage für den Oralimpfstoff der Wildschweine bildet, wurde

das C-Virus zunächst an primäre, später an permanente fetale Schweinenierenzellkulturen adaptiert (Glaner et al., 1984; Tesmer et al., 1985).

Nach Mayr et al. (1984) kommt es nach einer parenteralen Immunisierung mit Lebendvakzinen schon nach zwei Tagen zu einem Schutz infolge von Paramunitätsvorgängen. Die spezifische Immunität beginnt nach 5 bis 7 Tagen, während eine ausreichende Menge neutralisierender Antikörper meist erst nach drei Wochen ausgebildet ist.

Immune Muttersauen übertragen wie nach einer natürlichen Infektion maternale Antikörper auf ihre Ferkel. Maternale Antikörper verhindern eine frühzeitige aktive Immunitätsbildung nach einer Vakzination der Ferkel in den ersten 6 bis 9 Lebenswochen (Van Oirschot, 1994).

Untersuchungen von Wittmann et al. (1972) zur Immunitätsausbildung nach Immunisierung von Schweinen mit dem Riemser C-Vakzine-Stamm lassen erkennen, daß bereits am 3. d p.v. 75% und am 5. d p.v. 100% der Tiere eine gute Immunität aufwiesen, die sie vor einer parenteralen Infektion schützte. Vor einer Kontaktinfektion besteht sogar schon ein Schutz vom 2. d p.v. an. Diese frühe Immunität wird auf Virusinterferenz zurückgeführt. Die volle Immunität soll mindestens bis zum 12. Monat p.v. erhalten bleiben. Das Impfvirus konnte vom 3. bis maximal 11. d p.v. im Serum der Tiere nachgewiesen werden. Bei einem Teil der Tiere wurde während der Virämiephase auch Virus in der Muskulatur gefunden, welches bei -20°C für mindestens 9 Monate vermehrungsfähig blieb. Aus dem Fleisch isoliertes Impfvirus induzierte wiederum eine Immunität gegen KSP. Eine Virusausscheidung mit Kot oder Harn wurde nicht beobachtet, ebenso keine Übertragung des Impfvirus auf Kontakttiere.

Fischer et al. (1991b) fanden Impfvirus des C-Stammes zwischen dem 5. und 9. d p.v. bei vier von 49 immunisierten Tieren. Das Virus wurde dabei mittels DIFT ausschließlich in Tonsille und Milz, jedoch niemals im Knochenmark diagnostiziert.

Die Immunisierung mit dem C-Vakzine-Stamm wird auch von neugeborenen Ferkeln reaktionslos vertragen und verursacht keine Probleme im Fortpflanzungsgeschehen (Beer et al., 1978). Die Unschädlichkeit und Wirksamkeit der Schweinepest-Lebendvirusvakzine bei Immunisierung von tragenden Sauen stellten Tesmer et al. (1973) fest. Das Impfvirus konnte zwar diaplastentar übertragen werden und wurde bei einem Teil der Ferkel unmittelbar nach der Geburt im Blut gefunden, verursachte aber keine immunologische Toleranz und beeinträchtigte auch nicht die Immunität nach Aufnahme kolostraler Antikörper. Der maternale Antikörpertiter sank bei allen Ferkeln ab dem 30. bis 40. Tag post partum stark ab.

Urbanek et al. (1973) bewerteten die Möglichkeit des Einsatzes des Impfvirusstammes „C“ nach Seuchenausbruch. Dabei konnten mit KSPV infizierte, in der Inkubation befindliche und

krankte Tiere durch Immunisierung nicht geschützt werden. Schweine, die in der Inkubationszeit immunisiert wurden, erkrankten an den typischen Symptomen der Schweinepest. Bei überlebenden Tieren wurden mittels IFT in verschiedenen Organen keine persistierenden KSPV-Infektionen festgestellt. Um wirksam werden zu können, benötigt die Vakzine einen Vorlauf von ein bis zwei Tagen vor einer Kontaktinfektion. Im Falle einer metaphylaktischen Impfung sind alle erkrankten Tiere sofort aus der Gruppe zu entfernen, um eine massive Kontaktinfektion zu vermeiden.

Mit der Einführung der aerogenen, „nadellosen“ Immunisierung gegen KSP wurde auch die Vorarbeit für die orale Immunisierung geleistet. Der Eintritt und die Dauer der Immunität bei diesem Verfahren wurden durch Testinfektionen überprüft. Mit dem Riemser C-Vakzine-Stamm war die Schutzwirkung bei parenteraler Immunisierung 5 d p.v. und bei aerogener Immunisierung 6 d p.v. voll ausgebildet. Der Wirkungseintritt konnte allerdings durch gleichzeitige aerogene Immunisierung gegen KSP und Rotlauf um zwei Tage (4. d p.v.) vorverlegt werden. Rotlaufbakterien wie auch andere Bakterien scheinen hierbei die Funktion eines Adjuvans zu besitzen. Neutralisierende Antikörper traten erst etwa 14 d p.v. auf, so daß für den frühen Immunitätseintritt Interferon und zellvermittelte Immunmechanismen verantwortlich gemacht werden. Die Dauer der Immunität nach aerogener Immunisierung gegen KSP wird mit mindestens 7 Monaten angegeben. Bei der Überprüfung der Immunisierbarkeit von Ferkeln im Alter von 35 - 42 Tagen zeigte sich, daß der Infektionsschutz bei synchroner aerogener Immunisierung gegen KSP und Rotlauf vollständig erst am 6. d p.v. ausgebildet wird, der Immunitätseintritt also leicht verzögert ist. Die Schutzwirkung blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Monaten vollständig erhalten (Kaden und Glaner, 1982; Glaner et al., 1984; Kaden et al., 1985).

Terpstra und Wensvoort (1988) untersuchten die protektive Wirkung von kommerziell hergestellter C-Virus-Vakzine bei Schweinen ca. 8 Wochen nach der Immunisierung. Ihren Ergebnissen zufolge wird erst ab einem Antikörpertiter von >32 im NPLA ein Schutz sowohl des einzelnen Tieres als auch der gesamten Herde vor Virusausscheidern erreicht. Ab einem Titer von $>12,5$ können die Tiere aber schon als geschützt gegen einen schweren Krankheitsverlauf angesehen werden.

Bestätigen konnten Terpstra et al. (1990) den frühen Immunitätseintritt nach parenteraler Immunisierung mit der C-Vakzine. Schweine, welche 7 Tage nach der Immunisierung infiziert wurden, erkrankten nicht an KSP.

Dahle und Liess (1995) führten ebenfalls Untersuchungen über die Sicherheit der C-Vakzine durch. Dabei verwendeten sie zur Immunisierung die Riemser Zellkulturvakzine und zur Provokationsinfektion den KSPV-Stamm Alfort/187. Bei den immunisierten Tieren konnte weder eine Fieberreaktion noch eine Virämie festgestellt werden, während dies bei den Kontrolltieren der Fall war. Neutralisierende Antikörper wurden mittels Neutralisationstest bei allen Tieren zwei Wochen nach der Immunisierung festgestellt, bei einzelnen Tieren auch schon nach einer Woche. Obwohl noch nicht bei allen Tieren nach einer Woche neutralisierende Antikörper festgestellt werden konnten, erwiesen sie sich trotzdem als geschützt gegenüber einer Infektion mit virulentem KSPV und entwickelten auch keine Virämie.

Die Immunitätsausbildung nach oraler Immunisierung mit einem C-Vakzine-Stamm untersuchten Chenut et al. (1999), wobei bei Hausschweinen eine Serokonversion innerhalb von drei Wochen nach der oralen Verabreichung der Vakzine zu beobachten war. Alle Tiere waren 6 Wochen nach der Immunisierung gegen eine Infektion mit virulentem KSPV geschützt.

Mayr et al. (1984) weisen darauf hin, daß eine Immunisierung mit einer zu geringen Antigenmenge zu einer Sensibilisierung statt zur Immunität führen kann. In diesem Falle zeigen die Tiere eine erhöhte Anfälligkeit bei einer Infektion mit KSPV.

2.5.2.2. Wildschwein

Allein durch jagdliche Maßnahmen läßt sich die Schweinepest in den Schwarzwildbeständen mit hoher Bestandsdichte offensichtlich nur schwer tilgen. Hinzu kommt, daß sich die Seuche bei geringer Virulenz der Erreger selbst erhalten, unerkannt verbreiten und enzootischen Charakter erlangen kann, wie die Seuchengeschehen in Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg zeigen (Kaden, 1998a). Da dieser Zustand nicht akzeptabel ist und eine ständige Gefahr für die Hausschweinebestände von infiziertem Schwarzwild ausgeht, wurde Ende der 80er Jahre die Immunisierung von Wildschweinen in Erwägung gezogen. Voruntersuchungen fanden seit 1989 auf der Insel Riems statt (Kaden, 1993). Diese betrafen die Modifikation des Impfstoffes für die orale Applikation (Zusammensetzung und Virusgehalt) sowie die Köder- und Markerauswahl (Kaden, 1996; Kaden und Lange, 1997).

Chenut et al. (1999) untersuchten die Immunitätsausbildung nach oraler Verabreichung des C-Vakzine-Stammes an Wildschweine. Dabei wurden sieben von 8 Wildschweinen ca. 30 Tage

nach der oralen Vakzination serologisch positiv, während ein Wildschwein über den gesamten Untersuchungszeitraum von 70 Tagen serologisch negativ blieb.

Für den erfolgreichen Einsatz von Impfstoffen bei Wildtieren müssen einige Voraussetzungen beachtet werden. In erster Linie müssen begünstigende Faktoren, die das Infektionsgeschehen erhalten, beseitigt werden und Möglichkeiten vorhanden sein, den Erfolg der Immunisierung zu kontrollieren. Hohe Anforderungen sind an die Sicherheit des Impfstoffes zu stellen, um nachteilige Beeinflussung von anderen Wildpopulationen, Nutztierbeständen oder Menschen auszuschließen (Kaden, 1993). Chenut et al. (1999) überprüften neben der Wirksamkeit des C-Vakzine-Stammes ebenfalls dessen Sicherheit. Sie konnten keine Ausscheidung des Impfvirus feststellen und demzufolge auch keine Kontaktinfektion bzw. -immunisierung. Zusätzlich wurden Schafe, Kaninchen und Hasen als Beispiele für Tierarten, die in freier Natur an ausgelegte Impfköder gelangen können, oral vakziniert. Schafe zeigten dabei keinerlei klinische oder serologische Reaktionen auf die Immunisierung. Keine klinischen Reaktionen wurden bei Hasen beobachtet, während Kaninchen mit leichter Erhöhung der Körpertemperatur und Wachstumsverzögerung reagierten. Einige der Hasen und Kaninchen waren am Ende des Versuches serologisch positiv, Virusausscheidung wurde aber nicht festgestellt.

Für die Immunisierung von Wildtieren wird gefordert, daß der Impfstoff so verabreicht werden kann, daß dadurch bevorzugt die anvisierte Tierart angesprochen, die erforderliche Impfstoffaufnahme gewährleistet und das Immunsystem ausreichend aktiviert wird. Die Art der Formulierung des Impfstoffes darf den tierischen Organismus nicht negativ beeinflussen. Weiterhin muß der Impfstoff gegenüber Umwelteinflüssen widerstandsfähig sein (Loepelmann und Dedek, 1991; Kaden, 1993).

In der BFAV Insel Riems wurden dazu umfangreiche Untersuchungen mit verschiedenen Arzneiformen zur Impfstoffaufnahme, wie Hartgelatine kapseln, Pillen, Dragees und Köder mit Blister durchgeführt (Kaden, 1996; Kaden und Lange, 1998). Zur Verbesserung der derzeitigen Anwendung eines Impfstoffköders mit Blister werden von Kaden und Lange (1997) der Einsatz kleinerer Impfstoffköder oder aber gänzlich andere Prinziplosungen in Betracht gezogen.

Im Vorfeld der eigentlichen Immunisierung galt es weiterhin, geeignete Verfahren der Köderausbringung zu prüfen. Die Köderung kann beim Schwarzwild per Handauslage oder per Flugzeug erfolgen. Loepelmann (1994) stellt die hohen Anforderungen an das Personal bei einer Handauslage heraus, welches außer Revierkenntnissen auch einen hohen Grad an Zuverlässigkeit aufweisen muß. Vorteilhaft wirkt sich hierbei die Möglichkeit der Vorköderung aus, welche mindestens zwei Wochen lang auf einer ca. 200 m² großen Fläche mit Körnermais erfolgen sollte. Die Anzahl der Kurrungen ist abhängig von der landschaftlichen Gliederung der Fläche und der Höhe der Wilddichte. Die auszubringenden Impfköder sollten leicht in Erde oder Laub eingearbeitet werden, um Köderkonkurrenten abzuwehren. Eine bis zwei Wochen nach der ersten Köderausbringung wird eine Nachköderung empfohlen, wobei die Attraktivität der Kurrung in der Zwischenzeit durch Ausbringen von Körnermais zu erhalten ist. Bei Untersuchungen von Loepelmann und Dedek (1991) zeigte sich die Gruppenauslage nach Vorköderung der Einzelauslage von Ködern ohne Vorköderung weit überlegen, auch wenn bei beiden Verfahren die Hälfte der erlegten Tiere im Versuchsgebiet mit einer einmaligen Köderung erreicht wurden. Bei der Gruppenauslage wird die Attraktivität des Köderplatzes durch die Vorköderung erhöht, Köderkonkurrenten werden dadurch zurückgedrängt und die Verweildauer des Köders reduziert.

Schuster (1996) sieht in der Köderausbringung mittels Flugzeug eine geeignete Methode, Impfstoffe beim Wildschwein zu applizieren. Hierdurch soll die hierarchische Ordnung bei der Nahrungsaufnahme außer Kraft gesetzt werden.

Nach Loepelmann (1994) sind folgende weitere Voraussetzungen für eine Immunisierung von Wildtieren zu erfüllen: das Impfgebiet muß den Seuchenherd umschließen und das Befallsgebiet um mindestens 10 km überragen, wobei für seine Begrenzung natürliche Barrieren zu nutzen sind. Ein Kontrollgebiet sollte das Impfgebiet um mindestens 10 km überragen. Als günstigste Zeit für die Schwarzwildköderung sind die Monate März und April anzusehen, in denen noch Vegetationsruhe herrscht und die Rotten relativ stabil und standorttreu sind. Weiterhin möglich ist eine Köderung in der Zeit von Ende Oktober bis Mitte November, wobei hier allerdings die für die erfolgreiche Köderung erforderliche Jagdruhe dem hohen Jagddruck entgegensteht. Die Wirksamkeit der Köderung muß durch die Verwendung eines Markers oder den serologischen Nachweis des Impferfolges kontrollierbar sein, wobei die richtige Stichprobengröße der untersuchten Tiere wichtig ist.

Ein geeignetes Gebiet für einen wissenschaftlichen Pilotversuch, zu dem auch die Europäische Union (EU) ihr Einverständnis geben konnte, fand sich im Landkreis Soltau-Fallingb. in Niedersachsen. Dort begann im Oktober 1993 auf der Grundlage der in der BFAV Insel Riems geleisteten Voruntersuchungen die orale Immunisierung (o. I.) auf drei Truppenübungsplätzen. Sie wurde in halbjährlichem Abstand viermal wiederholt. Die Köderauslage erfolgte an Kirschen, welche zuvor über mehrere Wochen mit Körnermais beschickt worden waren, um die spätere Aufnahme der Köder durch die Wildschweine zu verbessern. Die Aufnahmerate der Köder durch Schwarzwild wird mit 70 bis 90 % angegeben, wobei versucht wurde, Nahrungskonkurrenten durch Eingraben oder Abdecken der Köder abzuwehren. Im Februar 1995 wurden bei 46 bis 49% der untersuchten Wildschweine im Immunisierungsgebiet Antikörper gegen das KSPV gefunden. Nach der 4. o. I. waren etwa 60% aller untersuchten Wildschweine Antikörperträger. Bei 52 bis 68% der gestreckten Stücke konnte der Marker Oxytetracyclin nachgewiesen werden. In den zwei zu Beginn infizierten Gebieten wurde nach der 2. o. I. kein KSPV mehr nachgewiesen. Das primär KSPV-freie Gebiet blieb dies auch während des gesamten Versuchszeitraums. Insgesamt wird die orale Immunisierung als eine wirksame und auch ökonomisch sinnvolle Maßnahme neben einer starken Bejagung angesehen (Kaden, 1995, 1996; Hillmann und Kaden, 1995; Kaden und Lange, 1997, 1998).

Kolomitsev et al. (1998) berichten über Erfahrungen mit der oralen Immunisierung von Schwarzwild in verschiedenen Regionen Russlands seit 1976. Zu Beginn wurde dabei eine Lebendvakzine vom Stamm „Hudson“ verwendet, welche allerdings einige Nachteile aufwies. Für Hausschweine war sie unsicher, da sie Aborte bei Sauen und erhöhte Mortalität bei Jungtieren verursachte. Weiterhin war sie auch in ihrer Wirksamkeit dadurch herabgesetzt, daß das Virus bei der Passage des Magens zum großen Teil neutralisiert wurde. Eine sichere und auf die orale Anwendung ausgerichtete Vakzine wurde 1991/92 entwickelt. Mit dieser konnte bei Schwarzwild eine zwei Wochen nach der Verabreichung einsetzende und über mindestens 10 Monate anhaltende Immunität erreicht werden. Der Anteil Wildschweine, welche seronegativ blieben, lag dabei bei 8 bis 18%.

2.6. Marker als Detektionssystem zur Überprüfung der Impfstoffaufnahme

2.6.1. Tetracycline

2.6.1.1. Pharmakologie der Tetracycline

Tetracyclin und Oxytetracyclin gehören zu den Breitspektrumantibiotika und werden aus verschiedenen Streptomyces-Arten isoliert. Doxycyclin und Minocyclin sind ihre partialsynthetisch gewonnenen Derivate. Tetracycline wirken bakteriostatisch auf grampositive und zahlreiche gramnegative Bakterien durch Hemmung der ribosomalen Proteinsynthese. Da Tetracycline eine wesentlich höhere Affinität zu Bakterien- als zu Säugerribosomen haben, sind sie nur gering toxisch.

Oxytetracyclin wird nach oraler Gabe zu 60 % resorbiert. Die Resorption kann durch Nahrung und die Anwesenheit zwei- und dreiwertiger Kationen beeinflusst werden. Tetracycline werden zu ca. 30% biotransformiert und biliär sowie renal ausgeschieden. Die Halbwertszeit beträgt ca. 10 Stunden (Mutschler, 1996).

2.6.1.2. Eignung der Tetracycline als Marker

Nach Stöhr et al. (1990a) sind an einen Ködermarker für Wildtiere folgende Anforderungen zu stellen: Unschädlichkeit für die Zieltiere und Köderkonkurrenten, hohe Stabilität im Köder, lange Nachweisbarkeit im Tier und einfache Nachweismethode. Dabei dürfen keine Probleme wegen eventueller Rückstandsbildung in Lebensmitteln tierischer und pflanzlicher Herkunft sowie Futtermitteln und Wasser auftreten.

Ein besonderes Verhalten der Tetracycline ermöglicht den Nachweis des oral aufgenommenen Wirkstoffes über einen ganzen Immunisierungszeitraum hinweg und auch darüber hinaus. Bedingt durch die besondere Affinität der Tetracycline zu zwei- und dreiwertigen metallischen Kationen kommt es z.B. mit Kalzium zur Bildung antibakteriell unwirksamer Chelate. Dabei entstehen Ablagerungsgebiete in den Mineralisationszonen der Knochen sowie in wachsenden Zähnen. Die Ablagerung der Tetracycline erfolgt sowohl subperiostal und subendostal als auch in der Peripherie der Osteone (Gutmann, 1987). Die Retentionszeit im Knochen beträgt mindestens mehrere Monate (Gemmer et al., 1973), wobei das Oxytetracyclin in dieser Zeit kontinuierlich abgegeben wird (Manz, 1976; Ebrecht, 1977).

Diese Markierung ist am deutlichsten nach intravenöser Applikation der Tetracycline. Aber auch die orale Applikation ergibt ähnlich gute Ergebnisse (Dämmrich, 1969).

Stöhr et al. (1990a) untersuchten den Einfluß unterschiedlicher Dosierungen von OTC auf die fluoreszenzmikroskopische Nachweisbarkeit bei Füchsen. Sie teilten positive Proben in deutlich positive, positive und schwach positive ein. Dabei konnten sie feststellen, daß bei höherer Dosis (untersucht wurde im Bereich zwischen 100 und 200 mg pro Köder) der Anteil der deutlich positiven Proben zunimmt. Chromatografisch wurden bei gleicher Applikationsdosis recht unterschiedliche OTC-Konzentrationen in der Knochensubstanz vorgefunden, welche wahrscheinlich auf individuelle Besonderheiten der OTC-Pharmakokinetik zurückzuführen sind. Aber auch die Tiere, die nur 100 mg (entspricht 20 bis 30 mg je kg Körpermasse) erhielten, reagierten positiv, so daß mit der im Feldversuch zur oralen Immunisierung von Füchsen gegen Tollwut verwendeten Dosis von 150 mg OTC die Einschätzung der Aufnahmerate erfolgen kann.

Die gute Verwendungsmöglichkeit von Tetracyclinderivaten zur Wirksamkeitskontrolle des Impfstoffeinsatzes in Wildpopulationen wird von Fischer et al. (1991a), Loepelmann und Dedek (1991), Kaden (1993) sowie Loepelmann (1994) hervorgehoben. Es soll an dieser Stelle deutlich erwähnt werden, daß hierbei die Köderaufnahme nachgewiesen wird, von der indirekt auf die Impfstoffaufnahme geschlossen werden kann.

2.6.1.3. Methoden des Nachweises von Tetracyclin im Knochen

Es kommen der fluoreszenzmakroskopische oder-mikroskopische sowie der mikrobiologische Tetracyclinnachweis, der Tetracyclinnachweis mittels Dünnschichtchromatografie oder Hochdruckflüssigkeitschromatografie als Nachweismethoden in Frage.

Die Fluoreszenz der Tetracycline wurde zuerst von Milch et al. (1957) beschrieben. Bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht wird eine gelbe Fluoreszenz sichtbar, welche durch das Naphthacengrundgerüst bedingt ist und somit bei allen Tetracyclinen auftritt. Nach Kämmerer (1965) liegt die optimale Anregungswellenlänge bei 436 nm, die Emissionswellenlänge der Tetracycline zwischen 460 und 650 nm.

Manz (1976) führte den Nachweis an Knochendünnschliffen durch und teilte bei der Beurteilung die Fluoreszenz in deutlich positiv, positiv und schwach positiv ein. Diese Methode erwies sich bei der routinemäßigen Ausführung als sehr arbeitsaufwendig (Hesse, 1985).

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung besteht das Prinzip immer darin, 20 bis 200 µm dünne Knochenscheiben herzustellen. Stöhr et al. (1990a) führten den Nachweis an

Knochenspänen, welche sie mit Hilfe einer Autopsie-Säge gewannen, durch. Diese Methode erwies sich als weniger aufwendig als die Herstellung von Knochendünnschliffen. Die Präparate wurden mit UV-Licht (465 nm) bestrahlt und auf spezifische Fluoreszenz untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß in den Knochenspänen der negativen Kontrolltiere eine Eigenfluoreszenz geringerer Intensität als die Tetracyclinfluoreszenz auftreten kann, welche aber gleichmäßig verteilt ist.

Dedek et al. (1991) legten einen Praxisbericht über die von Stöhr et al. (1990a) beschriebene Methode vor. Dabei fanden sie neben der spezifischen gelben bis gelblich-grünlichen Fluoreszenz in drei Fällen beim Schwarzwild ein orangefarbenes Leuchten. Eine stärkere Eigenfluoreszenz wurde in einigen Präparaten vom Schwarzwild beobachtet, wodurch Schwierigkeiten in der Beurteilung entstanden. Nach Fischer et al. (1991a) sind Gefrierschnitte von Knochen hinsichtlich einer exakten Beurteilung der Tetracyclin-Fluoreszenz besser geeignet als Knochenspäne.

Die Tetracyclinablagerungen finden sich nach Grabbe (1980) nicht nur im Bereich der osteoiden Säume bei der Knochenbildung, sondern auch in absterbendem oder abgestorbenem Knochengewebe als fleckförmige oder diffuse Fluoreszenz.

Nach Hesse (1985) ist die Aufarbeitung von Knochenproben für den Tetracyclin-Nachweis über eine Extraktion der Tetracycline in Salzsäure mit anschließender Behandlung im Ultraschallbad und Reinigung über eine XAD-2-Säule mit nachfolgender Trennung des Eluats in der HPLC möglich. Bei der Untersuchung von Wildtieren als mögliche Köderkonkurrenten bei der Fuchsimmunisierung gegen Tollwut wurde von ihm auch eins von insgesamt neun untersuchten Wildschweinen als Tetracyclin-positiv erkannt. Weiterhin wiesen nach den Auslagen durchgeführte Kontrollgänge des öfteren auf die Aufnahme der Köder durch Wildschweine hin.

2.6.2. Weitere Markersubstanzen

Verschiedene Wildtiere, z.B. Kojoten, Eichhörnchen, Falken, Dachse, Füchse und Kaninchen, wurden zur Untersuchung der Retention von oral verabreichten physiologischen Markersubstanzen herangezogen. Zum Einsatz kamen dabei Jodsäure, Mirex, Rhodamin B sowie eine Reihe anderer Marker.

Jodsäure bindet sich an Proteine im Blutplasma und erhöht somit die Menge proteingebundenen Jodes im Blut. Sie wurde als Kontrastmittel bei Röntgenuntersuchungen

eingesetzt. Bei den untersuchten Tieren konnte für 8 bis 20 Wochen eine Erhöhung des Jodspiegels im Blut um ein Vielfaches des Normalen festgestellt werden (Larson et al., 1981; Baer et al., 1985; Follmann et al., 1987; Knowlton et al., 1987).

Mirex kommt normalerweise nicht im Organismus vor. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Insektizid, welches mittels Gaschromatografie detektiert werden kann. Nach oraler Gabe wurde Mirex über die gesamte Untersuchungsperiode von 16 Wochen hinweg im Serum oder Plasma gefunden. In der Muskulatur waren die Werte nach diesem Zeitraum sogar noch höher als im Blut (Larson et al., 1981; Knowlton et al., 1987).

Rhodamin B hinterläßt Fluoreszenzbanden in Haaren und Nägeln von Säugetieren. Diese Banden wurde erstmals in einigen Haupthaaren von Kojoten vier Wochen nach der oralen Aufnahme der Substanz gefunden. Ab der 8. Woche waren nicht mehr bei allen getesteten Tieren Banden vorhanden. Die Nägel erwiesen sich als noch weniger geeignet zur Detektion (Knowlton et al., 1987).

2.7. Serologische und virologische Nachweisverfahren der KSPV-Infektion

2.7.1. Nachweis von Antikörpern gegen KSPV

Für den Nachweis von Antikörpern gegen das KSP-Virus sind verschiedene Methoden beschrieben worden. Gebräuchlich und bewährt ist der Neutralisationstest, bei dem die Virusvermehrung in der Zellkultur nach Inkubation mit dem Testserum untersucht wird. Als Detektionssystem dienen Fluoreszenz- oder Peroxidase-markierte Antikörper. Beide Test sind hochspezifisch und -sensitiv, aber zeitaufwendig (Liess und Prager, 1976; Holm Jensen, 1981; Moennig et al., 1990; Weiland et al., 1992).

Wensvoort et al. (1988) beschreiben einen CTB (complex trapping blocking)-ELISA, der mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern (mAk) arbeitet, welche unterschiedliche, für KSPV spezifische Epitope erkennen. Das Testserum wird mit KSPV-Antigen vorinkubiert. Sind im Serum KSPV-spezifische Antikörper vorhanden, verhindern diese die Bindung des POD-konjugierten mAk an das Antigen. Ein Farbumschlag zeigt also ein negatives Testserum an, wohingegen ein farbloses Well ein positives Testserum anzeigt. Antikörper gegen C-Vakzinevirus werden mit diesem Test ebenso detektiert wie Antikörper gegen Feldvirus. Keiner der beiden verwendeten mAk kann BVDV erkennen, so daß angenommen wird, daß BVDV keine Antikörper gegen die zwei Epitope induziert. Der CTB-ELISA wurde von Colijn et al. (1997) durch die Verwendung von rekombinantem KSPV-E2-Antigen verbessert.

Rekombinantes KSPV-E2-Antigen wird ebenfalls in einem indirekten ELISA verwendet, welcher von Moser et al. (1996) beschrieben und von Müller et al. (1996) evaluiert wurde.

2.7.2. Nachweis von KSPV-Antigen

Die ursprüngliche Methode des Antigennachweises ist der Immunfluoreszenztest, angewendet am Gewebeschnitt. Dafür wird ein Fluoreszein-Isothiocyant(FITC)-konjugiertes Anti-KSPV-Hyperimmunserum vom Schwein verwendet. Dasselbe Konjugat kann auch zum Virusnachweis in der Zellkultur verwendet werden. Dieser Test gestattet nicht, zwischen Feldvirus und Impfvirus zu unterscheiden und erkennt auch BVD-Virus. Besteht bei positivem Befund die Wahrscheinlichkeit einer vorausgegangenen Immunisierung oder BVDV-Infektion, so sind aufwendige Folgeuntersuchungen notwendig (Mengeling et al., 1963a, 1963b, Ressang und Den Boer, 1968).

Fischer et al. (1991b) untersuchten die diagnostische Sicherheit des direkten Immunfluoreszenztestes (DIFT) in verschiedenen Organen, darunter im Knochenmark. Die Untersuchungen erfolgten unter Verwendung des hochvirulenten KSPV-Stammes „Koslov“ und des Impfvirusstammes „C“. Dabei war die Nachweissicherheit für das hochvirulente KSPV im Knochenmark am höchsten, gefolgt von den Mandibularlymphknoten, den Kniefaltenlymphknoten und der Tonsille. Das Knochenmark erwies sich außerdem als einer der Orte des frühesten Antigennachweises nach stattgefundenener Infektion. Nach Immunisierung mit dem C-Vakzine-Stamm hingegen wurde das Virus nicht im Knochenmark gefunden. Dieses Verhalten läßt sich als differentialdiagnostisches Kriterium zur Unterscheidung zwischen Impf- und hochvirulentem Feldvirus nutzen. Da in 12,5 % der Fälle nach Infektion mit hochvirulentem Virus das Knochenmark nicht betroffen war, kann es sich bei negativem Befund im Knochenmark und positivem Befund in anderen Organen innerhalb von 10 Tagen p.v. sowohl um Impf- als auch um Feldvirus handeln. Wird ein solcher Befund später als 10 Tage p.v. erstellt, so handelt es sich i.d.R. um Feldvirus.

Das sensitivste Verfahren zum Virusnachweis stellt noch immer die Virusisolierung in der Zellkultur dar. Für die Anzucht von KSPV können verschiedene Zellkultursysteme genutzt werden. Die gebräuchlichsten sind Schweinehoden- oder Schweinenierenzelllinien, z.B. PK-15 (Moennig et al., 1990; Weiland et al., 1992; Caij et al., 1993). Der Nachweis infizierter Zellen erfolgt in einer Einschichtzellkultur z.B. in Mikrotiterplatten nach deren mehrtägiger Inkubation mit der zu testenden Probe. Eine hohe Spezifität wird durch den

Einsatz von mAk und den anschließenden Nachweis der Bindung dieser an infizierte Zellen mittels Peroxidase-konjugiertem Anti-Maus-IgG erreicht (Moennig et al., 1990; Weiland et al., 1992).

Die Verwendung von mAk bietet weiterhin eine sichere Lösung des Problems der Differenzierung zwischen Impf- und Feldvirus. Wensvoort et al. (1986, 1989a) stellten mAk her, mit deren Hilfe sie nicht nur KSPV detektieren, sondern auch zwischen Feldvirus, Impfvirus oder BVDV-Infektion unterscheiden konnten.

Mittels der von Hess et al. (1988), Zhou et al. (1989), Moennig et al. (1990) sowie Dahle et al. (1991) getesteten mAk war ebenfalls die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen KSPV und BVDV gegeben. Verfahren, in denen mAk angewandt wurden, erwiesen sich als spezifischer und sensitiver als solche mit polyklonalen Antikörpern. Lai und Ho (1989) wandten einen mAk gegen KSPV in einem Dot-Immuntest an.

Die Differenzierung verschiedener Schweinepeststämme mit Hilfe monoklonaler Antikörper wird, basierend auf der Arbeit von Weiland et al. (1990), bei Kosmidou (1995) und Kosmidou et al. (1995) beschrieben.

Eine völlig neue diagnostische Methode bot sich mit der Entwicklung der PCR (Polymerasekettenreaktion) an. Die PCR erwies sich als eine sehr schnelle Methode, welche allerdings z.T. in der Sensitivität hinter der Virusanzüchtung zurückbleibt. Liu et. al (1991) erreichten mit einem Schweinepest-spezifischen Primerpaar ein Detektionslimit von 10^4 KID₅₀. Wirz et al. (1993) fanden, daß die von ihnen entwickelte Pestivirus-spezifische PCR eine sehr hohe Sensitivität erreichte und damit noch Viruskonzentrationen erkannt wurden, welche nach Isolierung in der Zellkultur und Nachweis mittels Immunfluoreszenz (IF) nicht detektierbar oder von sehr niedrigem Titer waren. Dagegen konnten mit einer Schweinepest-spezifischen PCR nicht alle positiven Befunde der IF bestätigt werden. Harding et al. (1994) beschreiben eine RT-PCR, welche eine höhere Sensitivität aufweist als die vorhergehenden. Canal et al. (1996) finden beim Vergleich einer Pestivirus-PCR mit einer Schweinepest-PCR für erstere eine Sensitivität von 1 KID₅₀ gegenüber 100 KID₅₀ für letztere.

An dieser Stelle soll auf den Bundesmaßnahmenkatalog „Regime zur Diagnose der Schweinepest“ verwiesen werden, in welchem sich eine Zusammenfassung und Bewertung der verschiedenen Methoden zum Antikörper- bzw. Antigennachweis im Rahmen der KSP-Diagnostik, basierend auf der RL 80/217/EWG, befindet.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

3.1.1. Zelllinien

In der Tabelle 2 werden die drei eingesetzten, permanenten Zelllinien in verschiedenen Eigenschaften wie Herkunft, Morphologie, Verwendung welcher Zellbankpassagen u.a. beschrieben.

Tab. 2: Charakterisierung der Zelllinien laut Linienpass der Zellbank der BFAV Insel Riems

Linienbezeichnung	Beschreibung
PK-15 5-1	Schwein, Niere Ursprung unbekannt, seit ca. 25 Jahren am FLI Insel Riems Zahl der Subkultivierungen insgesamt unbekannt Umsatzrate 1:6 bis 1:10 Morphologie: epitheloid 50. bis 60. Zellbankpassage
EFN-R 86	Schwein, Niere, fetal Herkunft: Nieren zweier Feten ca. 5 Tage vor der Geburt, Aufschluß der Organe mit Versen/Trypsin, Alteration zur Permanenz zwischen 30. und 40. Subkultur, bis dahin Umsatzrate 1:2 Umsatzrate 1:6 bis 1:10 Morphologie: epitheloid 90. bis 100. Zellbankpassage
PKSU 9	Schwein, Niere Herkunft: Moskau, näheres unbekannt, seit über 20 Jahren am FLI Insel Riems persistent mit KSPV infiziert Morphologie: epitheloid ca. 100. Zellbankpassage

Subkultivierungen mit Versen/Trypsin/Gemisch: 8,0g/l NaCl, 0,4g/l KCl, 1,0g/l Dextrose, 0,58g/l NaHCO₃, 0,2g/l Versen, 0,5g/l Trypsin

3.1.2. Zellkulturmedien laut Zellbank der BFAV Insel Riems

L-EM: Leibovitz-ErhaltungsmEDIUM (3 Teile Hanks + 1 Teil L₁₅-Medium)

M7/199 RS (201): 1 Teil Medium 7 (hauseigene Rezeptur) und 1 Teil Medium 199 mit
Hanks-Salzen
+ 10% Rinderserum (Charge 201)

D-MEM RS (201): Dulbecco's Minimal Essential Medium mit Earle-Salzen
+ 10% Rinderserum (Charge 201)

D-MEM: Dulbecco's Minimal Essential Medium mit Earle-Salzen ohne Serumzusatz

MEM/MEM“E“/AS5%FKS5%Rd2: 1 Teil Eagle's Minimal Essential Medium mit Hanks-Salzen und 1 Teil Eagle's Minimal Essential Medium mit Earle-Salzen (2,2g/l NaHCO₃)

3.1.3. Virusstämme

Alfort 187: Herkunft: Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover,
Passagen auf PK15

Verwendung als a) Vollblut eines infizierten Schweines, gewonnen 9 Tage nach Infektion des Tieres, Virustiterbestimmung (PK15) zur Infektion;

b) Zellkulturüberstand (PK15-Passagen) als Positivkontrolle bei Virusanzüchtung bzw. Virusisolierung in der Zellkultur bzw. als Virus im VNT

C-Virus: Herkunft: Staatliches Allunionsforschungs- und kontrollinstitut Moskau
Vermehrung auf fetaler Schweineniere, später auf der Zelllinie 86
Vakzinevirus der Riemser Arzneimittel (RIAM) GmbH

3.1.4. Puffer und Lösungen

PBS⁻: Stammlösung (10fach konzentriert): 2 g KCl, 2 g KH₂PO₄, 80 g NaCl,
11,86 g Na₂HPO₄ x 2H₂O ad 1000 ml
Aqua dest. (pH 7,4)

Gebrauchsverdünnung: 100 ml Stammlösung ad 1000 ml Aqua dest.

PBS⁻-Tween: 1 l PBS⁻ + 20 Tropfen Tween 20

Glycerol-PBS⁻: 9 Teile Glycerol [Serva] und 1 Teil PBS⁻

Acetat/Essigsäurepuffer: 3,4 g CH₃COONa x 3H₂O (Natriumacetat-3-hydrat)

ad 500 ml Aqua dest.

mit 10%iger Essigsäure auf pH 5 einstellen

0,2 M Tris-HCl: 12,114 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Fluka)

ad 500 ml Aqua dest.

Evans Blue (Tris -HCl): Stammlösung: 0,1 g Evans Blau (Merck) in 100 ml 0,2M Tris-HCl

Gebrauchsverdünnung: 100 µl Stammlösung ad 10 ml 0,2M Tris-HCl

Evans Blue (PBS⁻): Stammlösung: 0,1 g Evans Blau (Merck) in 100 ml PBS⁻ (Aufbewahrung

über mehrere Monate im Kühlschrank möglich)

Gebrauchsverdünnung: 100 µl Stammlösung ad 10 ml PBS⁻

4 M Guanidinthiocyanat: 1. 0,75 M Na-Citrat (11g/50 ml) pH 7

2. 10% Sarcosyl (5g/50 g Lösung)

3. 25g GTC + 29,3 ml H₂O

+ 1,76 ml Lösung 1

+ 2,64 ml Lösung 2

2 M Na-Acetat pH 4,0: 13,6 g Natriumacetat / 50 ml

pH mit Essigsäure einstellen

oder:

3 M Na-Acetat pH 5,2: 20,412 g Natriumacetat / 50 ml

pH mit Essigsäure einstellen

DEPC-Wasser: 0,1% Diethylpyrocarbonat in Aqua dest. (100 ml Aqua dest. + 100 µl DEPC)

über Nacht bei 37°C inkubieren

3 x autoklavieren (1 Stunde bei 134°C)

5 x TBE-Puffer: 54 g Tris

27,5 g Borsäure

20 ml 0,5 m EDTA (pH 8,0)

für 1000 ml Aqua dest.

Agarose-Gel: 1,5 g Agarose (Serva) auf 100 ml 0,5 x TBE-Puffer

+ 10-25 µl Ethidiumbromid

3.1.5. Chemikalien

Aminoäthylcarbazol: 3-Amino-9-Äthylcarbazol (Sigma)

AMV-RT (Promega)

BSA: Bovines Serumalbumin (Boehringer Mannheim)
 DEPC: Diethylpyrocarbonat reinst (Serva)
 Dimethylformamid: N,N-Dimethylformamide, ACS-Reagent (SIGMA)
 DMSO: Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie (Roth)
 DNA-Marker (Promega)
 dNTPs: di-Nukleotidtriphosphate (Promega)
 Ethidiumbromid (Serva)
 Gentamycin: Gentamycin Solution, 50 mg Gentamycin / ml in deionisiertem Wasser (SIGMA Cell Culture™)
 GTC: Guanidinthiocyanat (Roth)
 Heparin: Heparin Lithium Salt, 25000 units (SIGMA)
 ME: 2-Mercaptoethanol reinst (Serva)
 Mineralöl für die Molekularbiologie (Roth oder Sigma)
 MgCl₂ (Promega)
 Na-Acetat-3-hydrat (Laborchemie Apolda - Germed)
 Na-Citrat: Tri-Natriumcitrat-Dihydrat für die Molekularbiologie (Merck)
 Phenol-Chloroform / Isoamylalkohol: Roti-Phenol-Chloroform (Roth)
 RNasin (Promega)
 Sarcosyl: N-Lauroyl-Sarcosine (SIGMA Molecular Biology)
 Taq DNA Polymerase (Promega)
 5xRT-Puffer (Promega)
 10xPCR-Puffer (Promega)

3.1.6. Konjugate und Seren

Pferdeserum (Whittaker oder Sigma)
 OP 42 (polyvalentes KSPV-Hyperimmunserum, FLI Insel Riems)
 FITC-markiertes Anti-Schwein-IgG (FLI Insel Riems)
 mAk-Mix / α -CSFV-a18: verschiedene KSPV-spezifische mAk, BFAV Tübingen
 (Dr. E. Weiland)
 Konjugate zum Nachweis monoklonaler Antikörper:
 -ImmunoPure® Goat Anti-Mouse IgG + IgM, [H + L], Peroxidase Conjugated (Pierce)
 -Goat Anti-Mouse Immunoglobulins / FITC (DAKO)

3.1.7. Geräte

Zentrifuge: Hettich Universal 30 RF

Ultrazentrifuge (Contron)

Thermocycler: Mini Cyclor™ (MJ Research)

Elektrophorese-Apparatur: (Wide) Mini Sub™ Cell (BIO-RAD)

Gefriermikrotom (Leica)

Trockenschrank: Thermocenter (Salvis)

Sterilfilter (Schleicher-Schuell)

Technicon H1 (Bayer Diagnostics)

3.2. Impfantigen

3.2.1. Vakzinevirus

Als Impfantigen dienten verschiedene Chargen des durch Kaninchenpassagen attenuierten C-Stammes des Virus der Klassischen Schweinepest. Die Produktion des Impfvirus erfolgte in der RIAM GmbH. Das C-Virus wurde anfangs in primären Schweinenierenzellkulturen, später in der permanenten Zelllinie 86 in Rollerkultur repliziert und durch zweimaliges Abfrieren geerntet. Als Anzuchtungsmedium wurde das Zellkulturmedium MEM/MEM“E“/AS5%FKS5%Rd2 verwendet. Nach Zusatz eines Stabilisators wurden 1,6 ml der Impfstoffsuspension in Blister aus PVC- und Aluminiumfolie (Schuster, 1996) mit einer Abmessung von 20x20x7 mm abgefüllt und bis zur Verköderung bei -20°C eingefroren. Der Impfstoff kann nach bisherigen Erfahrungen mindestens bis zu 10 Monate gelagert werden.

3.2.2. Charakterisierung der eingesetzten Impfstoffchargen

Vor ihrem Einsatz zur o. I. des Schwarzwildes wurden die einzelnen Impfstoffchargen auf ihre Wirksamkeit und Unschädlichkeit am Hausschwein geprüft sowie auf ihre Titer in der Zellkultur untersucht. Die zu den unterschiedlichen Auslagen verwendeten Impfstoffchargen und deren Titer (KID₅₀) sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Titration erfolgte in Zehnerpotenzen i.d.R. in der permanenten Zelllinie EFN-R, die Berechnung des Virustiters nach der Methode von Spearman und Kaerber (Mayr et al., 1974).

Tab. 3: Eingesetzte Impfstoffchargen und ihre Titer in der Zellkultur

	Chargenbezeichnung	KID ₅₀ / ml
1. Auslageperiode Dezember 1994	041094	10 ^{3,0} (PK15)
2. Auslageperiode März 1995	031094 041194	10 ^{4,0} 10 ^{3,7}
3. Auslageperiode Oktober 1995	050195	10 ^{4,75}
4. Auslageperiode März 1996	060595	10 ^{4,4}

Alle Chargen erwiesen sich bei experimentellen Voruntersuchungen am Tier als wirksam.

3.3. Impfstoffköder

3.3.1. Köderzusammensetzung

Die Impfstoffköder waren aus folgenden Einzelkomponenten zusammengesetzt: Rindertalg, Maismehl, ein Aromastoff sowie 150 mg Tetracyclin je Köder (Schuster, 1996). Diese Köderzusammensetzung erwies sich nach einer Reihe von Voruntersuchungen mit verschiedenen Ködervarianten an in Tierparks gehaltenen Wildschweinen als die von den Tieren bevorzugte.

3.3.2. Herstellung des Impfstoffköders

Das für die Impfstoffköderherstellung vorgesehene Virus wurde durch die RIAM GmbH mit einem Stabilisator entsprechend einer Rezeptur der BFAV versetzt und bei einer Temperatur von 4°C ins Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH transportiert, wo die Abfüllung in die Blister erfolgte. Vor der Verköderung wurden diese Blister i.d.R. bei -20°C tiefgefroren. Bei der Verköderung wurde der tiefgefrorene Blister in die auf ca. 50°C erhitzte Ködermasse eingebettet. Die Lagerung des abgekühlten fertigen Köders bis zur Auslieferung erfolgte bei -20°C.

3.4. Orale Immunisierung (o.I.) in Mecklenburg-Vorpommern

3.4.1. Immunisierungsgebiet

Das „Wildschweinpest“-gefährdete Gebiet in Mecklenburg-Vorpommern umfaßte zu Beginn der o.I. ein keilförmiges Gebiet von mehr als 5000 km² und erstreckte sich auf die Landkreise Bad Doberan, Nordvorpommern, Güstrow, Demmin und Ostvorpommern (siehe Karte Anlage 1). In diesem Gebiet waren durch das Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt (LVL) Rostock im Vorfeld bei Wildschweinen sowohl Antikörper gegen das KSPV als auch Virus gefunden worden.

Die Anlage des Immunisierungskorridors (Cordon sanitaire) erfolgte in der Weise, daß das gefährdete Gebiet von diesem im Westen, Süden und Osten vollständig umschlossen wurde, wobei im Westen und Osten der „Wildschweinpest“-gefährdete Bezirk in den Impfgürtel hineinragte. Im Norden bildete die Ostsee eine natürliche Barriere. Die Breite des Immunisierungskorridors wurde mit 20 bis 25 km veranschlagt, und seine Gesamtfläche betrug damit ca. 7000 km². In diesem Gebiet sollte dem Schwarzwild über aktive Immunisierung ein Schutz vor der Infektion mit KSPV verliehen werden, der eine weitere Ausbreitung der Erkrankung in der Population verhindern sollte.

Die Lage des Immunisierungsgürtels ist aus der Karte in Anlage 2 ersichtlich. Folgende Landkreise Mecklenburg-Vorpommerns waren mit einem Teil ihrer Fläche in die o.I. gegen KSP bei Schwarzwild einbezogen: Stadt Rostock, Bad Doberan, Nordwestmecklenburg, Parchim, Güstrow, Müritzt, Mecklenburg-Strelitz, Stadt Neubrandenburg, Demmin und Ostvorpommern.

Die Größe des Cordon sanitaire mußte in den verschiedenen Immunisierungsperioden verändert werden, da sich die KSP beim Schwarzwild weiter nach Süden und Westen ausbreitete. Durch das Auftreten der KSP beim Schwarzwild in Brandenburg an der Landesgrenze zu Mecklenburg-Vorpommern und die dort erfolgte Impfung wurde außerdem eine Ausdehnung des Impfgebietes in Mecklenburg-Vorpommern bis zur Landesgrenze Brandenburg erforderlich.

Die Veränderungen, die der Immunisierungskorridor im Laufe der ersten vier Immunisierungsperioden erfuhr, sind ebenfalls in der Karte der Anlage 2 festgehalten.

3.4.1.1. Auswahlkriterien und Ausgangsstatus der besonderen Untersuchungsgebiete

Für die vorliegende Arbeit wurden aus dem beschriebenen Immunisierungskorridor drei Gebiete ausgewählt, die sich im Dezember 1994 aus epidemiologischer Sicht (Vorhandensein von Virus und / oder Antikörpern gegen KSPV, siehe Tabelle 4) grundlegend voneinander unterscheiden.

Tab. 4: Epidemiologische Situation in den drei Untersuchungsgebieten der BFAV im Dezember 1994

Landkreis	Antikörper gegen KSPV	KSPV
Güstrow	positiv	positiv
Müritz	negativ	negativ
Ostvorpommern	positiv	negativ

Neben dieser verschiedenartigen Ausgangssituation hinsichtlich der Verseuchung mit KSPV erstreckten sich die Unterschiede zwischen den Gebieten auch auf die Biotopzusammensetzung. Während in den Landkreisen (LK) Güstrow und Ostvorpommern relativ ähnliche Biotope zu finden sind, unterscheidet sich das Gebiet des LK Müritz (Nationalpark) von diesen durch seinen hohen Wald- und Schilfanteil. Die geografische Lage der drei Landkreise ist der Anlage 2 zu entnehmen.

Vor dem Hintergrund dieser unterschiedlichen Bedingungen wurden die immunologische Reaktion des Schwarzwildes auf die o.I. gegen KSPV unter Feldbedingungen und die Tendenzen der Virusausbreitung beobachtet und eingeschätzt.

3.4.2. Organisation und Durchführung der oralen Immunisierung

3.4.2.1. Köderauslagen

Die Impfstoffköder wurden unmittelbar vor der Auslage an zentrale Stellen in den Landkreisen ausgeliefert, wo sie bis zur Verteilung an die Forstämter bei -20°C gelagert wurden. Am Tage der Auslage erhielten die Forstämter eine Anzahl Impfstoffköder entsprechend der Größe ihres Einzugsgebietes, bezogen auf Einstandsgebiet, Ruhezone und unter Beachtung der Spezifik des Biotops bzw. der zu erwartenden Schwarzwilddichte. Die Anzahl analysierter Köderplätze und Ködermengen für die 1. o.I. sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Ermittlung des Bedarfs an Impfstoffködern und der Anzahl Köderplätze (Kirrungen) im Impfgebiet

Kreis	Bezugsfläche Wald-und Schilffläche km ²	Wichtungs -faktor	Bezugsfläche insgesamt km ²	Anzahl Köderplätze	Anzahl Impfstoffköder (1. und 2. Auslage)
Güstrow	212	1,5	318	318	25400
Müritz	361	1,5	542	542	43360
OVP	216	1,5	324	324	25920

Quelle: Erlaß zur Durchführung eines Feldversuches zur o. I. von Schwarzwild gegen KSP im Land Mecklenburg-Vorpommern, Schwerin; 26.10.1994

Die Beköderung erfolgte auf sogenannten Kirrungen, die zum Teil auch zwischen den Auslagen betrieben und zum Strecken des Wildes genutzt wurden. Es sollten, ausgehend von den Erfahrungen in Niedersachsen (Kaden, 1994; Hillmann und Kaden, 1994), mindestens eine Kirrung pro km² Einstandsgebiet angelegt werden. Spätestens zwei Wochen vor den Auslageterminen wurde auf den Kirrungen eine Anfütterung des Schwarzwildes mit Mais vorgenommen, der etwas in den Boden einzuarbeiten war. Dies geschah fortführend im Abstand von etwa zwei Tagen bis zur 2. Auslage der Impfstoffköder der jeweiligen Immunisierungsperiode. Das Ziel war es, einen regelmäßiger Belauf der Kirrstellen durch das Schwarzwild zu erreichen, um die Impfstoffköderaufnahme in erster Linie durch die anvisierte Tierart zu gewährleisten. Entsprechende Kontrollen und die Einschätzung der Eignung der Kirrungen für die Köderausrage erfolgten anhand der für das Schwarzwild charakteristischen Fährten und Wühlspuren (Gebräch). Für die flächenmäßige Größe der Kirrstellen wurden mindestens 100 m² (idealerweise 200 m²) empfohlen. Die 40 auf jeder Kirrung pro Auslage auszubringenden Köder sollten auf mindestens 8 Einzeldepots verteilt werden. Diese Vorgaben wurden bei den Auslagen in den LK Güstrow und Müritz auch weitgehend erfüllt, im LK Ostvorpommern kann davon nach eigener Überprüfung nicht ausgegangen werden. Die Forderung nach möglichst großen Köderplätzen und das Prozedere der Auslage begründet sich aus der Struktur und Rangfolge innerhalb einer Schwarzwildrotte, wonach die ranghöchsten Tiere bei der Futteraufnahme den Vortritt haben. Um auch den rangniederen Tieren, vor allem den jüngeren, die Köderaufnahme zu ermöglichen, müssen für diese getrennte Depots angelegt werden, an denen sie nicht mit den ranghöheren Wildschweinen in Konflikt geraten. Pro Depot wurden je nach Gebiet 2 bis 8 Impfstoffköder ausgelegt, wobei die vollständige einmalige Aufnahme einer Impfdosis (ein Köder) für die

Immunitätsausbildung ausreichend, die Aufnahme mehrerer Dosen aber völlig unschädlich ist (Kaden, 1993). Die Depots wurden angelegt, indem der Boden einen Spatenstich tief ausgehoben, die entsprechende Anzahl Köder hineingegeben und der Erdaushub wieder darübergegeben und leicht festgedrückt wurde. Die Köder sollten mindestens 5 cm mit Erde bedeckt sein. Waren alle Depots auf diese Weise angelegt, wurde über die Fläche der gesamten Kirtung 1 bis 2 kg Mais gestreut. Eventuellen Köderkonkurrenten sollte durch das Eingraben der Zugang zu den Ködern erschwert werden. An den darauffolgenden Tagen bzw. spätestens nach Ablauf von 5 Tagen wurden die Kirtstellen kontrolliert. Besondere Beachtung erfuhren dabei das Auffinden von Schwarzwildmarkierungen oder -spuren im Boden sowie die anhand von Fährten eingeschätzte oder auf Beobachtungen basierende Annahme der Kirtplätze durch andere Tierarten. Dazu wurden außerdem die nach fünf Tagen übriggebliebenen Köder oder Blister eingesammelt und auf Bißspuren untersucht. In gleicher Weise wurde bei der 2. Auslage verfahren, wobei die Lage einzelner Kirtungen gegebenenfalls nach den Ergebnissen der 1. Auslage korrigiert wurde.

Es fand zweimal jährlich eine Immunisierung im Herbst/Winter und im Frühjahr statt. Die Immunisierungszeitpunkte wurden in Abhängigkeit vom zu erwartenden Nahrungsangebot (Vegetation) und von den Mondphasen (verstärkter Jagdbetrieb bei Vollmond) festgelegt. Um möglichst vielen Wildschweinen die Gelegenheit zur Köderaufnahme zu geben bzw. um die Impfwirkung durch Boosterung noch zu verstärken, wurde die Köderauslage zweimal im Abstand von zwei Wochen durchgeführt. Somit gab es in jedem Jahr (mit einer Ausnahme) zwei Immunisierungsperioden mit je zwei Köderauslagen. Die genauen Termine sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Zeitpunkte der erfolgten Impfköderauslagen

	1. Köderauslage	2. Köderauslage	Bemerkungen
1. Immunisierungsperiode	06.12.1994	20.12.1994	kurze Vorbereitungsphase wegen aktueller Situation
2. Immunisierungsperiode	24.03.1995	07.04.1995	
3. Immunisierungsperiode	27.10.1995		nur eine Auslage !
4. Immunisierungsperiode	29.03.1996	12.04.1996	Frost bei 1. Auslage

3.4.2.2. Analyse der Köderaufnahme

Zur Einschätzung der Köderaufnahme wurden Angaben der zuständigen Forstbehörden herangezogen, die diese auf der Grundlage der beschriebenen Nachkontrollen ermittelten und auf einheitlichen Formblättern festhielten. Ein Beispiel dafür ist in Anlage 3 zu finden. Eine genauere Auswertung würde den Rahmen dieser Arbeit allerdings sprengen.

3.4.2.3. Probenziehung und Erfassung eingegangener Proben

Die serologische und virologische Untersuchung des gesamten Immunisierungskorridors oblag dem LVL Rostock. In den drei beschriebenen Untersuchungsgebieten wurden gestreckte Wildschweine doppelt beprobt und jeweils an das LVL Rostock und die BFAV Insel Riems eingeschickt. Die Doppelbeprobung war notwendig, da durch die Landesuntersuchungsstelle die Virusfreiheit des Wildes möglichst rasch nachgewiesen werden mußte, damit dieses ohne Verzug in den Handel gelangen konnte, während die Probenuntersuchung in der BFAV aus methodischen Gründen etwas mehr Zeit beanspruchte. Die Probennahme erfolgte entweder beim Aufbrechen des Wildes noch vor Ort durch den Jäger, im zuständigen Forstamt durch die dortigen Bediensteten oder in den Wildsammelstellen durch einen beauftragten Tierarzt.

Folgende Organe wurden als Untersuchungsmaterial entnommen:

- ein Röhrchen nicht gerinnungsgehemmtes Blut (Schweiß) aus Brust- oder Bauchraum,
- ein Stück Niere,
- ein Stück Milz,
- Tonsille,
- Mandibularlymphknoten sowie Darmlymphknoten,
- ein ca. 10 cm langes Stück Rippe oder Brustbein und
- ein Lauf mit Mittelfußknochen.

Vor Beginn der Immunisierungsmaßnahmen wurde ein Hinweisblatt zur Probennahme verteilt, welches in Anlage 4 beigelegt ist.

Den in der BFAV eingegangenen Proben war ein Probenbegleitschein hinzugefügt, dem die wichtigsten Daten zur Herkunft, zum Alter und Geschlecht des erlegten Wildschweins sowie eventuelle besondere Beobachtungen zu entnehmen waren (siehe Anlage 5). Für die altersmäßige Erfassung der Tiere wurden die drei Kategorien Frischling (unter ein Jahr),

Überläufer (ein bis zwei Jahre) und adultes Tier (über zwei Jahre) verwendet. Jedes Einzeltier erhielt eine fortlaufende Labornummer. Die Einträge auf dem Probenbegleitschein wurden in Datenbanken übertragen. In diese Datenbanken wurden auch Bemerkungen zur Vollständigkeit der eingesandten Proben sowie letztlich alle Untersuchungsbefunde aufgenommen.

3.5. Nachweis des Virus der Klassischen Schweinepest

3.5.1. Aufbereitung der Proben zur Untersuchung

3.5.1.1. Organproben

In die Untersuchung zum KSPV-Nachweis wurden Milz, Niere, Tonsille, Darm- und Mandibularlymphknoten einbezogen. Die Organproben eines Wildschweines wurden als Pool angerieben, indem etwa 1 g Gewebe (zu gleichen Teilen unter sterilen Bedingungen den verschiedenen Organen entnommen) mit einer Schere zerkleinert und mit der gleichen Menge sterilem Seesand in einem Mörser zerrieben wurde, bis eine nahezu homogene „Masse“ entstand. Die Mischung wurde mit 5 ml sterilem L-EM (0,1%iger Gentamycinzusatz) aufgeschwemmt und in ein steriles Glasröhrchen überführt. Danach wurde der Mörser mit weiteren 5 ml dieses Mediums ausgespült, welches der ersten Aufschwemmung hinzugefügt wurde. Die Glasröhrchen wurden mit Parafilm „M^{cc}®“ verschlossen, zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur Virusextraktion über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zentrifugation der Organanreibungen bei 4000 rpm (1600 x g) bei 4°C für 30 min. Der so gewonnene Überstand wurde in der Sterilwerkbank in 4,5-ml-Cryo-Röhrchen (Nalgene) abgefüllt und bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C aufbewahrt.

3.5.1.2. Knochenmarksproben

Als weiteres Organ wurde bei den Wildschweinen das Knochenmark zur Untersuchung auf KSPV herangezogen. Mit Hilfe einer Zange wurde die Rippe bzw. das Brustbein an einer geeigneten Stelle gequetscht. Ein Tropfen vom roten Knochenmark wurde auf einem fettfreien Objektträger aufgenommen und mit einem weiteren Objektträger ausgestrichen. Es folgte eine Lufttrocknung der beiden erhaltenen Knochenmarksausstriche, die danach bei Raumtemperatur für 10 min in wasserfreiem Aceton fixiert und nach vollständiger Trocknung

bei -18°C bis -25°C bis zur Bearbeitung gelagert wurden. Die längste überprüfte Lagerfähigkeit betrug 6 Monate.

3.5.1.3. Vollblutproben

Die Untersuchung von Vollblutproben auf KSPV erfolgte nur im Zusammenhang mit Vakzinations- bzw. Infektionsstudien an Tieren. Von erlegten Wildschweinen wurden keine Blutproben zur Untersuchung auf Virus herangezogen.

Es wurde heparinisiertes Vollblut verwendet, welches aus der V. cava cranialis entnommen wurde. Das Heparin wurde in 5 ml sterilem Aqua dest. aufgelöst und davon 100 μl für ein Blutvolumen von maximal 10 ml verwendet. Nach einem einmaligen Gefriertauprozess des Vollblutes (Einfrieren bei -20°C) wurde dieses zum Virusnachweis herangezogen.

3.5.1.4. Buffy Coat

Vor dem Einfrieren der wie unter 3.5.1.3. beschrieben gewonnenen Vollblutproben wurden 2 ml Vollblut unter sterilen Bedingungen entnommen und in ein steriles Röhrchen verbracht. Die Proben wurden bei 1200 rpm (145 x g) und 12°C für 10 min zentrifugiert. Die sich absetzende mittlere weiße Schicht aus vorwiegend Leukozyten, zwischen Erythrozyten und Plasma gelegen, wurde mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und ca. 500 μl davon in ein steriles Röhrchen überführt. Es schloß sich eine Behandlung der gewonnenen Leukozyten mit 2 ml Aqua dest. an, um die mit überführten Erythrozyten weitgehend zu zerstören (Aqua dest.-Schock). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μl PBS⁻-Stammlösung nach 60 Sekunden gestoppt. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 1000 rpm (100 x g) und 12°C für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment in 1 ml L-EM + 0,1% Gentamycin aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.5.1.5. Nasentupfer

Nasentupferproben wurden nur bei Tierversuchen entnommen.

Dazu wurde zunächst je nach Bedarf D-MEM oder L-EM mit 0,1 % Gentamycin versetzt, je 1 ml davon in sterile Glasröhrchen gegeben und diese mit Silikonstopfen verschlossen. Bis zur Verwendung erfolgte die Aufbewahrung der so vorbereiteten Röhrchen einige Tage im

Kühlschrank. In Reagenzgläsern wurden die entsprechenden Wattetupfer bei 140°C autoklaviert.

Zur Probennahme wurde aus beiden Nasenhöhlen eines Tieres mit einem Nasentupfer Sekretmaterial entnommen. Der Nasentupfer wurde anschließend in das Glasröhrchen mit Medium verbracht und nach einer i.d.R. über Nacht andauernden Extraktion bei Kühlschranktemperatur bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen und Ausdrücken eines Tupfers wurde das das Probenmaterial enthaltende Medium zentrifugiert, um grobe Bestandteile zu entfernen. Anschließend folgte eine Filtration des Überstandes mittels eines Sterilfilters von 0,45 µm Porengröße. Das erhaltene Filtrat wurde für den Virusnachweis in der Zellkultur eingesetzt.

3.5.2. Virusnachweis in der Zellkultur

3.5.2.1. Behandlung und Erhaltung der Zelllinien

Die Zelllinien aus der Zellbank der BFAV Insel Riems wurden im Labor routinemäßig in Povitzky-Flaschen (Demeterflaschen) kultiviert. Die Zellumsetzung erfolgte, wenn der Zellrasen vollständig bzw. nahezu vollständig geschlossen war und die Mehrzahl der Zellen ihr typisches Zellbild (ohne Degenerationserscheinungen) aufwies. Dazu wurde das Anzuchtungsmedium (AZM) entfernt und der Zellrasen anschließend mit insgesamt 30 ml Versen/Trypsin-Gemisch dreimal gespült. Nach dem 3. Spülvorgang wurde das Versen/Trypsin-Gemisch bis auf einen den Boden benetzenden Rest von ca. 0,5 ml entfernt. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde durch vorsichtiges Schwenken der Povitzky-Flasche und eventuell Erwärmen bei 37°C unterstützt. Dieser Vorgang sollte nach etwa 10 bis 15 min abgeschlossen sein. Die abgelösten Zellen wurden unverzüglich in AZM aufgenommen. Dabei wurden die Zelllinien PK-15 und 86 in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:10 in AZM aufgenommen und umgesetzt. Darunter ist zu verstehen, daß z.B. bei einem Verhältnis von 1:6 die sechsfache Menge Medium gegenüber der eingesäten Zellsuspension für die Aufnahme der abgelösten Zellen verwendet wird. Das sind in diesem Fall für 20 ml eingesäte Zellsuspension 120 ml AZM. Als Erhaltungsmedium (EM) für die Linie PK-15 diente M7/199 RS (201), für die Linie 86 MEM/MEM"E"/AS5%FKS5%Rd2. 20 ml der Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen / ml wurden in eine Povitzky-Flasche eingesät. Nach maximal 20 Passagen wurden die Zelllinien durch Zellen jüngerer Passagen aus der Zellbank ersetzt.

3.5.2.2. Anzüchtung des KSPV in der Zellkultur

Die Organanreibungen, Vollblut- und Buffy coat-Proben wurden in der Regel in der permanenten Zelllinie PK-15 angezüchtet. In Ausnahmefällen, d.h. bei Tierversuchen mit speziellen Fragestellungen, wurde zusätzlich die Zelllinie EFN-86 verwendet. Dies ist an entsprechenden Stellen erwähnt.

Für die Prüfung der Wildschweinorgananreibungen auf KSPV wurde 5 ml der Zellsuspension der Linie PK-15 mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen / ml in Vierkantflaschen ausgesät. Als AZM diente hierbei, wie auch für die Erhaltung der Zelllinie, M7/199 RS (201). Nach einer Wachstumsphase der Zellen für 48 bis 72 Stunden bei 37°C (Ausbildung eines zu mindestens 80% geschlossenen Zellrasens) wurden die einzelnen Flaschen mit den Organanreibungen beimpft. Dazu wurde 0,8 bis 1 ml der aufgetauten und auf Raumtemperatur erwärmten Organsuspension auf den Zellrasen gegeben, von dem vorher das Anzüchtungsmedium entfernt wurde. Die beimpften Flaschen wurden anschließend für ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem Entfernen der Organsuspension vom Zellrasen und einmaligem Spülen der Zellen mit L-EM wurde jede Flasche mit 5 ml L-EM, welches mit 0,1% Gentamycin und 5% Pferdeserum versetzt war, beschickt. Nach 72 Stunden Bebrütung bei 37°C wurden die Zellen zur Virusernte einem zweimaligen Gefriertauprozess unterzogen. Zum Nachweis des KSPV aus Organanreibungen wurden die Proben nach diesem ersten Anzüchtungsschritt insgesamt noch zweimal auf der gleichen Zelllinie passagiert, indem 1 ml der angezüchteten Probe auf eine Vierkantflasche mit frischen Zellen übertragen und wie oben verfahren wurde. Der Waschschriff wurde bei den Folgepassagen nach dem Entfernen des Inoculums weggelassen. Dieses Vorgehen wurde in der gleichen Weise noch einmal wiederholt, um auch möglichst sehr geringe Ausgangsvirusmengen nachzuweisen.

Der spezifische Nachweis des KSPV erfolgte von der zweimal gefriergetauten Anzüchtung der Organanreibung und der gleichfalls zweimal gefriergetauten letzten Zellkulturpassage in einem PK-15-Monolayer in 24-Well-Zellkulturplatten (Greiner). Hierfür wurde 1 ml der Zellsuspension der Linie PK-15 mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen / ml in jedes Well ausgesät. Als AZM diente D-MEM RS (201), in welchem die Zellen nach der oben beschriebenen Ablösung mittels Versen/Trypsin-Gemisch im gleichen Verhältnis wie für Flaschen aufgenommen wurden. Nach einer 48- bis 72stündigen Inkubation im CO₂-

Brutschrank mit den Bedingungen 5% Kohlendioxid und 90% Feuchtigkeit bei 37°C war der Monolayer i.d.R. zu mindestens 80% geschlossen. Sodann wurde das Medium entfernt und jedes Well mit 0,2 ml der zu untersuchenden Probe beimpft, wobei die Proben stets in Doppelbestimmung angesetzt wurden. Auf jeder Zellkulturplatte wurden außerdem eine Positivkontrolle (Alfort 187) und eine negative Mediumkontrolle (D-MEM) mitgeführt. Nach einer ein- bis zweistündigen Virusadsorption im CO₂-Brutschrank (unter den genannten Bedingungen) wurden die Proben und Kontrollen entfernt und die Zellen mit 1 ml EM, bestehend aus D-MEM mit Zusatz von 0,1% Gentamycin und 5% Pferdeserum, überschichtet. Die Platten wurden anschließend für 72 Stunden unter 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.5.2.3. Virusnachweis mittels indirektem Immunperoxidase-Monolayer-Assay (IPMA)

Von den unter 3.5.2.2. beschriebenen inkubierten Zellkulturplatten wurde nach 72 Stunden der Überstand entfernt und die Platten einmal mit Waschlösung (1/3 PBS⁻ und 2/3 Aqua dest.) gespült. Nach Abgießen der Waschlösung wurden die Platten ausgeklopft und mittels eines Föns in Kaltluft getrocknet. Danach wurden sie im Trockenschrank zwei Stunden bei 80°C hitzefixiert. Die so vorbereiteten Platten wurden i.d.R. in Gefrierbeutel eingeschweißt und bis zu ihrer weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Nach dem Auftauen der Platten wurden diese einmal kurz mit Waschlösung gespült und ausgeklopft. Die Gebrauchsverdünnung des KSPV-spezifischen mAk-Mix, je nach Charge 1:60 bis 1:80; wurde mit PBS⁻-Tween angesetzt. Pro Well wurden 200 µl dieser mAk-Mix-Verdünnung einpipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der mAk-Mix abgegossen, die Platte 5x kurz mit PBS⁻-Tween gewaschen und anschließend ausgeklopft. Die Gebrauchsverdünnung des Konjugates von 1:2000 wurde ebenfalls mit PBS⁻-Tween angesetzt und davon 200 µl in jedes Well pipettiert. Die Inkubationszeit betrug auch hier eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach Abgießen des Konjugates wurden die Platten fünfmal kurz mit PBS⁻-Tween und einmal mit Aqua dest. gespült und ausgeklopft. Als letzter Schritt wurde in jedes Well 200 µl Substrat gegeben. Das Substrat wurde unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt (Reagenzien zuvor auf Raumtemperatur erwärmen!). Für eine Platte (Bedarf 5 ml) wurden 2 mg Aminoäthylcarbazol in 0,3 ml Dimethylformamid gelöst und dann mit 5 ml 0,05M Acetat/Essigsäurepuffer (pH 5,0) vermischt. Abschließend wurde 25 µl 3%ige H₂O₂-Lösung dazugegeben. Nach einer 10- bis 15minütigen Einwirkzeit des Substrates

bei 37°C mit anschließender Inkubation für weitere 15 bis 20 min bei Raumtemperatur erfolgte die Beurteilung der Platte.

Bewertung: Eine Platte ist auswertbar, wenn bei der Positivkontrolle die braunrötliche, für das KSPV spezifische Anfärbung des Zytoplasmas unter Aussparung des Zellkerns vorliegt. Die zu untersuchende Probe ist positiv, wenn einzelne oder mehrere Zellen in gleicher Weise spezifisch angefärbt sind.

Die Anlage 6 zeigt Beispiele für mit KSPV infizierte und nicht infizierte PK15-Zellen in der Zellkulturplatte.

3.5.3. Nachweis von KSPV im Knochenmark

3.5.3.1. Direkter Immunfluoreszenztest (DIFT)

Nach dem Auftauen der nach 3.5.1.2. vorbereiteten und eingefrorenen Präparate (Knochenmarksausstriche) wurden diese einmal kurz in PBS⁻ gespült und anschließend erneut luftgetrocknet. Danach wurden ca. 2 cm² eines mäßig dicken Bereiches des Ausstriches ausgewählt, mit einem PAP PEN (SCI Science Services) umrandet und dieses Feld je nach seiner Größe mit 100 bis 200 µl FITC-anti-KSPV-HIS (hausinterne Chargen, Verdünnung nach Vortestung) in der jeweiligen Gebrauchsverdünnung in einer 0,2M Tris-HCl-Pufferlösung mit einem 0,001%igem Evans Blue-Anteil überschichtet. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37°C für eine Stunde in der feuchten Kammer. Nach dem Abgießen des Konjugates erfolgte dreimaliges Spülen in PBS⁻ und Einstellen der Objektträger in frisches PBS⁻ für 10 min sowie zweimaliges Spülen in Aqua dest. Nach dem Lufttrocknen der Präparate wurden diese in noch mäßig feuchtem Zustand in Glycerol-PBS⁻ mittels Deckgläschen eingedeckt. Die so bearbeiteten Objektträger ließen sich mehrere Tage bei Kühlschranktemperatur und vor Licht geschützt aufbewahren. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nokia) mit der für FITC üblichen Wellenlänge von 492 nm.

3.5.3.2. Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Bei fraglichen oder positiven Ergebnissen der Knochenmarksproben im DIFT wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) auf dem zweiten Objektträgersausstrich durchgeführt, ebenso bei allen in der Zellkultur positiv bewerteten Organproben unabhängig vom Ergebnis des DIFT im Knochenmark.

Hinsichtlich der Vorbereitung der Präparate wurde wie unter 3.5.3.1. verfahren. Das umschriebene Feld wurde zunächst mit der Gebrauchsverdünnung des mAk-Mix (wie unter 3.5.2.3.) überschichtet und eine Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Abgießen des mAk-Mix, dreimaligem Spülen der Objektträger in PBS⁻, einmaligem Spülen in Aqua dest. und anschließendem Lufttrocknen wurde auf das markierte Feld FITC-Konjugat gegen Maus-Immunglobuline in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS⁻ mit 0,001%igem Evans Blue-Zusatz aufgetragen und anschließend in der feuchten Kammer bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach dem Abgießen des Konjugates wurden die Präparate dreimal in PBS⁻ gespült, für 10 min in frisches PBS⁻ eingestellt und anschließend zweimal in Aqua dest. nachgespült. Nach Lufttrocknung der Präparate wurden diese in noch mäßig feuchtem Zustand in Glycerol-PBS⁻ mittels Deckgläschen eingedeckt.

Bewertung: Zu jedem Ansatz (sowohl bei DIFT als auch beim IIFT) wurde eine Positivkontrolle von einem an KSP erkrankten Tier sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Fluoreszenz ist als spezifisch anzusehen, wenn sich bei einer Wellenlänge von 492 nm eine grüne Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen des blutbildenden Gewebes zeigt und das virusfreie Kontrollpräparat eindeutig negativ ist.

In der Anlage 7 sind im DIFT untersuchte Knochenmarksausstriche von mit KSPV infizierten Schweinen dargestellt.

3.5.4. Virusnachweis mittels Polymerasekettenreaktion

3.5.4.1. Isolierung der RNA

Einige der Proben mit positivem Antigennachweis in der Zellkultur oder / und im Knochenmark wurden auf das Vorhandensein des Genoms des KSPV in der Organanreicherung untersucht.

Zunächst wurde 1 ml der Organanreicherung (1:10) in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer-Tube, Kontron) überführt und bei 40000 rpm (91750 x g) und 4°C für 45 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zur Präparation der RNA nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) verwendet.

Bei sämtlichen der nachfolgenden Schritte erfolgte die Probenbearbeitung auf Eis.

Dem Sediment wurden zuerst 500 µl Guanidinthiocyanat (GTC) und 4 µl Mercaptoethanol (ME) hinzugefügt und die Röhrchen für 10 min geschüttelt. Die Suspension wurde anschließend in ein steriles Eppendorf-Röhrchen überführt, 50 µl 2M Natrium-Acetat

hinzugegeben und gevortext. Danach wurde die Probe mit 500 µl Phenol-Chloroform / Isoamylalkohol versetzt und nach gründlichem Mischen für 20 min auf Eis gefällt, gefolgt von einer Zentrifugation für 25 min bei 12000 rpm (9700 x g) und 4°C. Durch den Zentrifugationsprozeß kommt es zu einer Phasentrennung, wobei Proteine in der unteren und mittleren Phase, Nukleinsäuren jedoch in der oberen wäßrigen Phase zu finden sind. Diese nukleinsäurehaltige Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig abgehebert und in ein steriles Eppendorf-Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 1 ml 99%igem, -20°C kaltem Ethanol (Roth) und anschließendem Vortexen erfolgte die RNA-Fällung für mindestens eine Stunde bei -20°C. Daran schloß sich eine Zentrifugation bei 12000 rpm (9700 x g) und 4°C für 25 min an. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 300 µl GTC und 2,4 µl ME gelöst. 600 µl 99%iges, -20°C kaltes Ethanol wurden hinzugefügt und eine Fällung über Nacht bei -20°C durchgeführt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 12000 rpm (9700 x g) und 4°C für 25 min wurde der Überstand wiederum entfernt und das Pellet mit 600 µl 75%igem, -20°C kaltem Ethanol gewaschen, wobei diesmal die Zentrifugation bei 10000 rpm (6700 x g) und 4°C für 15 min ausgeführt wurde. Die nachfolgende Trocknung des Pellets fand für 25 min im an die hauseigene Vakuumanlage angeschlossenen Exsikkator (Roth) statt. Das getrocknete Pellet wurde mit 50 µl DEPC-Wasser versetzt und für 10 min bei 65°C im Wasserbad gelöst. Zur Lagerung wurden anschließend 100 µl 99%iges, -20°C kaltes Ethanol hinzugegeben und dieses Gemisch bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5.4.2. Reverse Transkription und Amplifikation

15 µl der extrahierten und in Ethanol gelagerten RNA wurden abgenommen, in 0,5-ml-Eppendorf-Tubes überführt und bei 12000 rpm (9700 x g) und 4°C für 25 min zentrifugiert. Zum anschließenden Trocknen des Pellets (für 10 bis 25 min) wurde die unter 3.5.4.1. ausgewiesene Technologie verwendet.

Grundlage für das weitere Vorgehen bildete das von Liu et al. (1991) beschriebene Verfahren, welches für unsere Zwecke etwas variiert wurde. Die Primer wurden in der angegebenen Sequenz von der Firma GIBCO synthetisiert. Für den antisense-Primer (KSP-1) wurden die Nukleotide 1469 bis 1488 (5'-CTTATCTGGAGGGCCTTCTG-3') und für den sense-Primer (KSP-2) die Nukleotide 1189 bis 1208 (5'-AGTGACAACGGCACTAATGG-3') ausgewählt.

Nach Zufügen eines Mixes aus 2,5 µl DEPC-Wasser, 0,25 µl DMSO und 0,5 µl Primer KSP-1 zu jeder getrockneten Probe wurde eine Denaturierung bei 98°C für 7 min und anschließenden 42°C für 2 min durchgeführt. Danach erfolgte eine kurze Zentrifugation der Proben.

Entsprechend der zu untersuchenden Probenzahl sowie einer Negativkontrolle wurde ein RT-Mix angesetzt, je Probe bestehend aus 3 µl 5xRT-Puffer, 0,3 µl dNTPs, 0,075 µl BSA, 7,875 µl DEPC-Wasser, 0,25 µl RNasin und 0,25 µl AMV-RT. Dadurch wurden Endkonzentrationen von 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DDT, 0,5mM dNTPs, 10u RNasin und 2,5u AMV-RT erreicht. Je 11,75 µl wurden zu jeder denaturierten Probe pipettiert, so daß das Endvolumen 15 µl betrug. Anschließend erfolgte die Reverse Transkription bei 42°C für eine Stunde und danach die Kühlung der Proben auf 4°C sowie eine erneute kurze Zentrifugation.

Nach der Reversen Transkription wurde ein PCR-Mix, bestehend aus 3,5 µl 10xPCR-Puffer, 3,5 µl MgCl₂, 0,5 µl Primer KSP-2, 27,25 µl sterilem Aqua bidest. sowie 0,25 µl Taq DNA-Polymerase je Probe angesetzt. Das entspricht Endkonzentrationen von 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ sowie 1,25u Polymerase im PCR-Mix. Davon wurden je 35 µl zu jedem RT-Gemisch pipettiert. Das Endvolumen von 50 µl wurde durch Vortexen gemischt und dann mit 35 µl Mineralöl bedeckt. Die Amplifikation wurde für 35 Zyklen im Thermocycler (Biozym) ausgeführt. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 98°C für 3 min bestand jeder Zyklus aus 15 Sekunden Denaturierung, einer Minute Renaturierung bei 50°C und 15 Sekunden Elongation bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurde die Elongationszeit um 2 min verlängert und abschließend die Proben auf 4°C gekühlt.

3.5.4.3. Analyse der amplifizierten DNA

Die erhaltenen PCR-Produkte (10 µl eines jeden RT-PCR-Mixes + 5 µl Ladepuffer) wurden mittels Gel-Elektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer bei 80V für eine Stunde analysiert. Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht beurteilt. Es wurde jeweils ein Marker mitgeführt.

Bewertung: Beim Auftreten von DNA-Banden mit 300 bp wurde die Probe als KSPV-positiv bewertet.

3.6. Nachweis von KSPV-spezifischen Antikörpern im Serum von Haus- und Wildschweinen

Das eingesandte nicht gerinnungsgehemmte Blut wurde zur Gewinnung von Serum herangezogen. Dazu wurden die Röhrchen bei 3500 rpm (1230 x g) und 4°C für 10 min zentrifugiert und der erhaltene Überstand zum Antikörpernachweis mittels der nachfolgend aufgeführten Methoden untersucht.

3.6.1. CTB-ELISA-System

In Anbetracht des großen Probenumfangs setzten wir den kommerziell verfügbaren Ceditest Complex-Trapping-Blocking ELISA (ID-DLO Lelystad) zum Screening der Wildschweinseren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen KSPV ein.

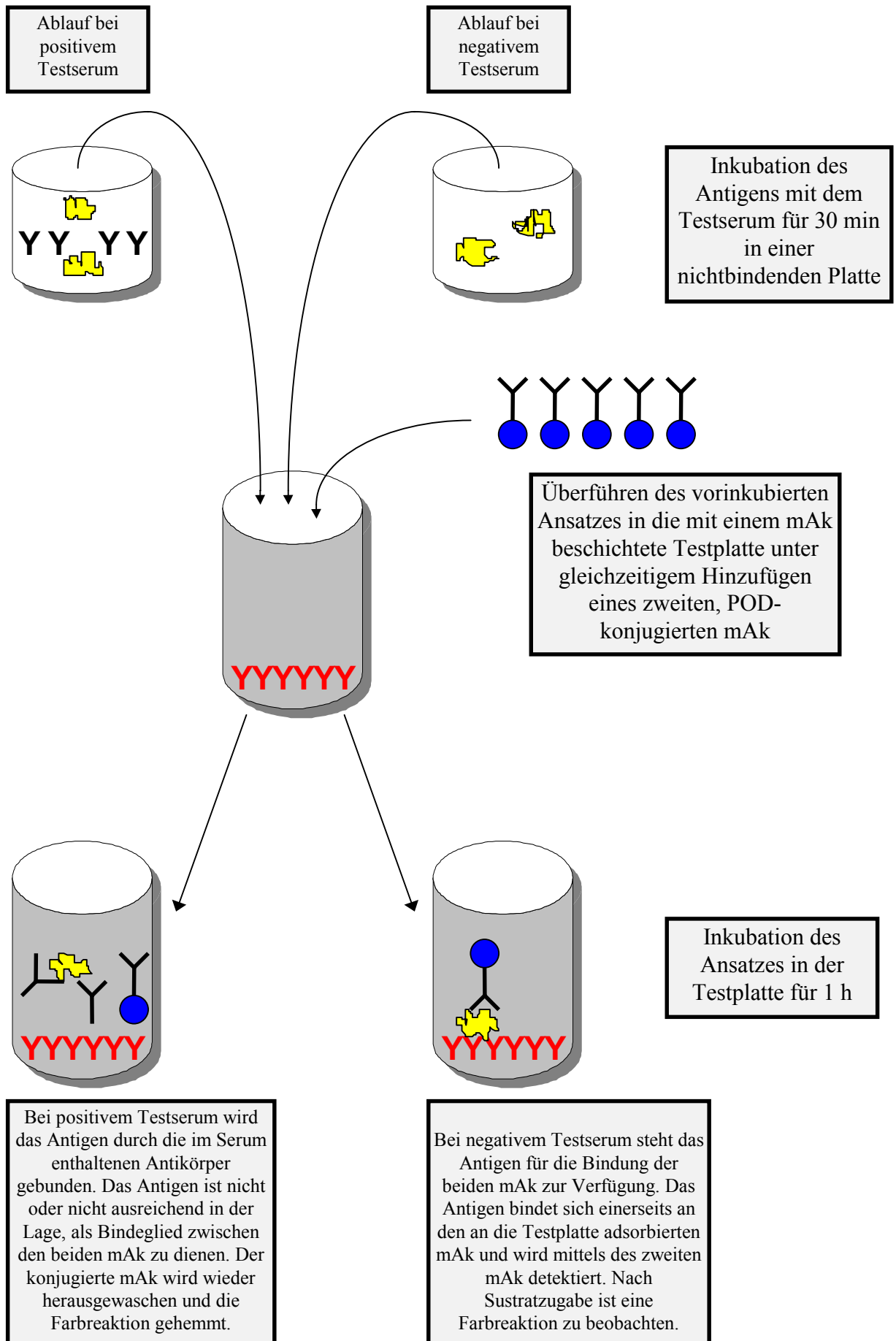
Dieser CTB-ELISA basiert auf der Anwendung zweier monoklonaler Antikörper, die gegen das Hüllprotein E2 des KSPV gerichtet sind, sowie dem Einsatz eines KSPV-E2-Antigens, welches über Baculovirus als Expressions-Vektor hergestellt wird (Colijn et al., 1997).

Testprinzip: Zunächst wurde das Testserum mit dem KSPV-E2-Antigen in einer nichtbindenden Mikrotiter-Platte vorinkubiert. Der mit Peroxidase (POD) konjugierte mAk wurde in seiner Gebrauchsverdünnung den Reaktionsvertiefungen der mit einem weiteren mAk beschichteten ELISA-Platte hinzugefügt. Anschließend wurde das vorinkubierte Serum-Antigen-Gemisch aus der nichtbindenden Mikrotiter-Platte in die Testplatte überführt. Nach der folgenden Inkubation und dem Waschen der Testplatte wurde die Reaktion mit Hilfe einer Chromogen-Substrat-Lösung sichtbar gemacht. Als Chromogen diente hierfür TMB und als Substrat Wasserstoffperoxid. Nach dem Stoppen der Farbreaktion mit Schwefelsäure erfolgte deren Messung im ELISA-Reader bei 450 nm und die Berechnung der Hemmung der Farbreaktion anhand mitgeführter Referenzseren.

Bewertung: Eine Farbreaktion wird induziert, wenn keine KSPV-Antikörper im Testserum enthalten sind, da das KSPV-E2-Antigen ungehindert an beide mAks binden kann. Sind allerdings ein oder beide Epitopen des E2-Antigens durch KSPV-Antikörper aus dem Testserum gehemmt, wird das Konjugat ausgewaschen und die Reaktionsvertiefung bleibt farblos.

Der Reaktionsablauf ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Abb. 1: Schematische Darstellung des Testprinzips des CTB-ELISA-Systems



3.6.2. Indirekter Immunfluoreszenztest

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) zum Nachweis von Antikörpern gegen das KSPV wurde zur Abklärung von im CTB-ELISA fraglichen Seren verwendet. Weiterhin wurden alle virologisch positiven Proben ungeachtet ihres Ergebnisses im ELISA getestet.

Wir verwendeten die in der Zellbank der BFAV Insel Riems vorhandene Zelllinie PKSU, die permanent mit KSPV infiziert ist. Die Zellen wurden als Suspension in Zellkulturmedium von der Zellbank bereitgestellt. Zunächst erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm (100 x g) bei 4°C für 10 min. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Sediment zwei- bis dreimal unter Verwendung von PBS⁻ gewaschen, indem der Vorgang des Zentrifugierens in beschriebener Weise wiederholt wurde. Anschließend wurde die Zellzahl mit PBS⁻ auf ca. 2 - 5 x 10⁵ Zellen / ml eingestellt. Die Zählung der Zellen erfolgte in der Thoma- oder Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die auf oben genannten Zellgehalt eingestellte Suspension wurde auf Multislides (12 Wells) ausgetropft (20 µl Zellsuspension pro Well). Nach dem Lufttrocknen der Objektträger, welches durch Zuhilfenahme eines Föns (Kaltluft) vorsichtig beschleunigt werden kann, erfolgte die Fixation der Objektträger in wasserfreiem Aceton für 10 min bei Raumtemperatur. Nach erneuter Lufttrocknung wurden die Objektträger bei -18°C bis -25°C eingefroren. Auf diese Weise können sie ca. 6 Monate aufbewahrt werden.

Zur Durchführung des IIFT wurden die aufgetauten Präparate kurz in PBS⁻ gespült und an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte die Beschickung von je 2 Wells mit je 20 µl des zu untersuchenden, vorverdünnten Serums. Die Verdünnung des Serums erfolgte für im CTB-ELISA fragliche Proben in den Stufen 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 und eventuell 1:400. Für eine Endtiterbestimmung wurde mit einer Serumverdünnung von 1:100 begonnen und diese bis 1:1600 fortgeführt, gegebenenfalls auch weiter. Die Inkubation der Serumverdünnungen fand für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer statt. Nach Abgießen der Serumverdünnungen, dreimaligem Spülen in PBS⁻ und kurzem Nachspülen in Aqua dest. erfolgte ein Lufttrocknen der Präparate und anschließendes Überschichten mit jeweils 20 µl FITC-markiertem Anti-Schwein-IgG. Das Konjugat wurde 1:60 mit 0,001%igem Evans Blue / PBS⁻ verdünnt. Es folgte eine einstündige Inkubation der konjugatüberschichteten Präparate in der feuchten Kammer bei 37°C. Nach Abgießen des Konjugatgemisches schloß sich eine Differenzierung der Objektträger in auf 40°C erwärmtem 20%igem Triethylenglycol (Riedel de Haen) für etwa 5 -10 Sekunden an, wodurch sich unspezifische Bindungen des Konjugates an

die Zelle weitgehend beseitigen lassen. Danach erfolgte ein erneutes dreimaliges Spülen in PBS⁻ sowie ein abschließender längerer Spülvorgang, bei dem die Objektträger für 10 min in frisches PBS⁻ eingestellt wurden. Im Anschluß daran wurde zweimal in Aqua dest. nachgespült und luftgetrocknet. Zuletzt wurden die noch etwas feuchten Präparate in Glycerol-PBS⁻ mit Deckgläsern eingedeckt. Die so erhaltenen Präparate waren bei Kühlschranktemperatur bis zur Betrachtung einige Tage lagerfähig.

Die Betrachtung unter dem Mikroskop (Nikon) erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm.

Bewertung: Die Spezifität der Fluoreszenz wurde durch das Mitführen einer Positiv- und einer Negativkontrolle bei jedem Ansatz überprüft. Das Auftreten einer spezifischen Fluoreszenz bei einer Serumverdünnung von $\Sigma 1:200$ spricht für das Vorhandensein einer belastbaren Immunität gegen das Virus der KSP. Titer ab 1:50 sind jedoch bereits als serologisch positive Reaktion zu bewerten (Kaden, 1993).

Ein Beispiel für diesen Nachweis ist in Anlage 8 zu finden.

3.7. Nachweis von Oxytetracyclin in Knochen

3.7.1. Mikroskopischer Nachweis

Zum Zwecke des mikroskopischen OTC-Nachweises wurden pro erlegtem Wildschwein in der Regel zwei Knochen herangezogen, und zwar der Mittelfußknochen und die Rippe, in einigen Fällen aber auch Brustbein oder Zungenbein. Mit dem Gefriermikrotom wurden pro Knochenprobe jeweils zwei hauchdünne Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und mittels Glycerol-PBS⁻ eingedeckt. Die Betrachtung der Knochenschnitte erfolgte unter dem Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm. Die vom OTC mit den Metallionen gebildeten Chelate emittieren dadurch Licht von ca. 540 nm Wellenlänge, wodurch die gelb-orangen Ablagerungen in den Mineralisationszonen der Knochen sichtbar werden (siehe Anlage 9).

3.7.2. Untersuchung mittels HPLC

Einige Knochenproben wurden zum Vergleich mit den durch mikroskopische Betrachtung gewonnenen Ergebnisse für den Nachweis mit der HPLC aufgearbeitet.

Die Extraktion der Tetracycline erfolgte in Anlehnung an die bei Hesse (1985) beschriebene Methode am Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Oldenburg. Diese Aufarbeitung ist spezifisch für Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin.

Zur Extraktion wurden 2 g des grob zerkleinerten Probenmaterials für 12 Stunden in 1m Salzsäure eingelegt. Danach folgte eine Reinigung des Salzsäureüberstandes über eine XAD-Säule und eine weitere Aufreinigung des gewonnenen Eluates über eine RP-18ec-Kartusche. Dieses Eluat wurde im Rotationsverdampfer getrocknet, in HPLC-Flußmittel aufgenommen und in der HPLC analysiert. Die Detektion erfolgte mittels UV-vis- oder Dioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 355 nm und durch Fluoreszenzdetektion (Anregung: 355 nm, Emission: 538 nm). Zur Identifizierung der Substanzen diente der Vergleich der Retentionszeiten von Tetracyclin-, Oxytetracyclin- und Chlortetracyclinstandards (Sigma).

3.8. Bestimmung von Blutbildparametern

3.8.1. Leukozytenbestimmung

Sämtliche Blutbilder wurden mit dem Technicon H1 angefertigt.

Die Zählung der Leukozyten und die Erstellung des Differentialblutbildes basiert auf einer Peroxidasemethode. Dabei macht man sich das Vorhandensein endogener Peroxidase in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Monozyten zunutze. Lymphozyten enthalten keine endogene Peroxidase. Nach Hämolyse der Erythrozyten entwickelt die Peroxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und einem Chromogen (4-Chloro-1-Naphthol) ein dunkelgefärbtes Präzipitat in den Zellen. Die einzelnen Leukozyten werden anschließend photometrisch durch ihr Absorptions- und Streulichtverhalten klassifiziert. Die abschließende Zuordnung zu den Zelltypen erfolgt außer auf der Grundlage des Peroxidasegehaltes auch anhand der Größe der Zellen.

3.8.2. Thrombozytenbestimmung

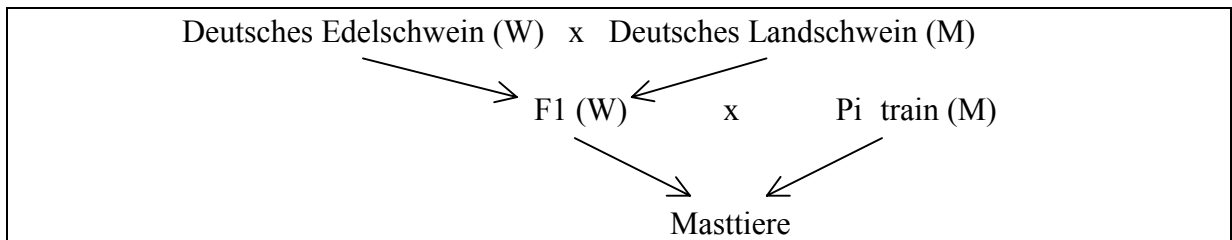
Die Thrombozytenzählung erfolgt beim Technicon H1 gemeinsam mit der Erythrozytenzählung. Anzahl und Größe der Thrombozyten werden durch zytometrische Lichtstreuung eines Lasers bestimmt.

3.9. Tierversuche

3.9.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Bei den für die Tierversuche genutzten Hausschweinen handelte es sich um Absatzferkel eines Mastbestandes aus dem Schweinezuchtbetrieb R. Wolter in Grabowhöfe (Abbildung 2).

Abb. 2: Abstammung der für die Tierversuche verwendeten Läuferschweine



W = weiblich, M = männlich

Die Schweine wurden im Isolierstallgebäude der BFAV Insel Riems in Gruppen von maximal fünf Tieren in Buchten mit einer Größe von ca. 15 m² freilaufend gehalten. Das Gebäude ist mit einem Unterdrucklüftungssystem ausgestattet. Gefüttert wurde handelsübliches Ferkel- oder Mastfutter entsprechend Alter und Gewicht der Tiere nach Herstellerangaben.

3.9.2. Untersuchung zur Antikörperentwicklung nach o.I. gegen KSP bei anschließender Challengeinfektion

3.9.2.1. Verwendete Antigene

Zur o.I. wurde KSP-Virus des C-Stammes aus der RIAM mit der Bezeichnung „SPCh 041194“ verwendet. Das Virus hatte in der Zelllinie EFN-R einen Titer von 10^{3,9} KID₅₀/ml und wurde in einer Menge von 2 ml jedem Schwein der Versuchsgruppe direkt ins Maul appliziert.

Die vier Wochen später durchgeführte Infektion erfolgte mit hochvirulentem KSP-Virus des Stammes Alfort 187 intranasal. Der Virustiter betrug 10^{2,3} KID₅₀/ml, wobei jedes Schwein 1ml dieses Challengevirus erhielt.

3.9.2.2. Versuchsablauf

Am Tag der o. I. wurden von allen fünf Absatzferkeln Blut- und Nasantupferproben entnommen. Bis zum 11. d p.v. wurden Vollblut, Buffy coat sowie Nasantupfer dreimal pro Woche auf das Vorhandensein von 0 Impfvirus untersucht. Als Testsystem zur Impfvirusisolierung diente die Zelllinie 86, wobei der Virusnachweis mittels IPMA erfolgte. Desweiteren wurde Serum an denselben Tagen sowie zusätzlich 18 d p.v. im CTB-ELISA und im IIFT (PKSU-Zellen) auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen KSPV untersucht.

Am 35. Tag p.v. erfolgte die Challenge-Infektion mit hochvirulentem KSPV. Während der folgenden zwei Wochen wurden die Tiere im Abstand von drei bis vier Tagen dreimal wie beschrieben virologisch und serologisch untersucht und eine weitere Woche später getötet, wobei Vollblut- und Serumproben sowie Organproben (Milz, Niere, Mandibular- und Darmlymphknoten, Tonsille, Ileum, Großhirn, Kleinhirn, Ammonshorn, Pons und Medulla oblongata) entnommen wurden. Die Virusisolierung aus den genannten Organen erfolgte in der Zelllinie PK-15. Als Detektionssystem wurde der indirekte IPMA eingesetzt.

3.9.3. Wirksamkeit der oralen Immunisierung bei gleichzeitiger Infektion mit hochvirulentem KSPV geringer Dosis

3.9.3.1. Verwendete Antigene

Die o.I. der Absatzferkel der Versuchsgruppe erfolgte mit dem C-Stamm des KSPV. Die verwendete Charge aus der RIAM GmbH trug die Bezeichnung „SPCh 031094“ und wies einen Titer von $10^{4,0}$ KID₅₀/ml auf. Der Impfstoff wurde in einer Menge von 2 ml pro Tier direkt ins Maul verabreicht.

Die gleichzeitige Infektion der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe erfolgte intranasal mit hochvirulentem KSPV des Stammes Alfort 187 mit einer Infektionsdosis von 30 KID₅₀.

3.9.3.2. Versuchsablauf

Den fünf Absatzferkeln der Versuchsgruppe wurden vor der o.I. und intranasalen Infektion mit dem hochvirulenten KSPV zunächst Blut- und Nasantupferproben entnommen.

Die drei Absatzferkel der Kontrollgruppe wurden nach der Probennahme (Statuserhebung) nur intranasal infiziert.

Die Kontrolle der Körpertemperatur und des Allgemeinbefindens erfolgte bis zum Ende des Versuches täglich. Die Entwicklung der Körpermasse wurde zu Beginn des Versuches, nach 14 Tagen und bei Verenden bzw. zum Ende des Versuches erfaßt.

Bis zum 14. d p.v. wurden die Tiere dreimal wöchentlich, danach bis zum 35. d p.v. / p.i. einmal wöchentlich virologisch und serologisch untersucht. Zum Virusnachweis wurden Vollblut, Buffy coat und Nasentupfer herangezogen, wobei je nach nachzuweisendem Virus die Zelllinien PK-15 für Alfort 187 bzw. 86 für die C-Vakzine eingesetzt wurden. Die Kontrolle des Serums auf KSPV-spezifische Antikörper erfolgte außer am Beginn des Versuchs ab dem 12. d p.v. / p.i. im CTB-ELISA und im IIFT auf PKSU.

Am 35. d p.v. / p.i. wurden die überlebenden Tiere getötet und Blut-, Serum- sowie Organproben wie unter 3.8.2.2. entnommen. Die Isolierung und der Nachweis des Challengevirus erfolgten in der Zelllinie PK-15.

3.9.4. Wirksamkeit der oralen Immunisierung bei gleichzeitiger Infektion mit schwachvirulentem KSPV

3.9.4.1. Verwendete Antigene

Die o.I. der Absatzferkel erfolgte wiederum mit der Charge „SPCh 031094“ des C-Stammes des KSPV mit einem Titer in der Zelllinie 86 von $10^{4,0}$ KID₅₀/ml in der Menge von 2 ml pro Tier der Versuchsgruppe.

Die zeitgleiche Infektion der Versuchs- und Kontrollgruppe wurde mit dem KSPV-Isolat MV140 von einem Wildschwein aus Mecklenburg-Vorpommern vorgenommen. Dabei handelte es sich um Virus, welches nach der Erstisolierung aus der Wildschweinprobe und mehreren Zellkulturpassagen auf der Linie PK-15 einem Hausschwein verabreicht und aus dessen Blut reisoliert worden war. Die verwendete Passage nach der Reisolierung war die dritte in der Linie PK-15. Die Infektion erfolgte intranasal mit einer Menge von 1 ml, wobei das Challengevirus auf der Zelllinie PK-15 einen Titer von mindestens $10^{5,2}$ KID₅₀/ml aufwies.

3.9.4.2. Versuchsablauf

Zehn Absatzferkel wurden in zwei Gruppen zu je fünf Tieren aufgeteilt und voneinander isoliert aufgestellt. Nach einer angemessenen Eingewöhnungsphase, in welcher eine tägliche Kontrolle der Körpertemperatur sowie des Allgemeinbefindens stattfand, wurden alle Tiere

gewogen, erstmals geblutet und Nasentupferproben zur Stuserhebung genommen. Anschließend erfolgte die o.I. und intranasale Infektion der Tiere der Versuchgruppe bzw. nur die intranasale Infektion bei den Tieren der Kontrollgruppe .

Während der folgenden vier Wochen erfolgte eine tägliche Kontrolle der Körpertemperatur und des Allgemeinzustandes sowie wöchentliche Kontrolle der Entwicklung der Körpermasse. Ein Virusnachweis aus dem Vollblut, aus Buffy coat sowie aus Nasentupferproben und eine Blutbildbestimmung wurden während der ersten beiden Wochen dreimal wöchentlich, anschließend zweimal wöchentlich durchgeführt. Der Tierversuch wurde am 32. Tag mit der Tötung der Tiere beendet.

4. Ergebnisse

4.1. Feldversuch o.I. gegen KSPV bei Schwarzwild in Mecklenburg-Vorpommern

4.1.1. Untersuchung auf das Vorhandensein KSPV-spezifischer Antikörper

4.1.1.1. Landkreis Güstrow

Auswertung der 1. und 2. Immunisierungsperiode

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß sich gegenüber den drei Monaten nach der 1. o.I. die Gesamtzahl untersuchter Wildschweine nach der 2. o.I. (7 Monate) um etwa das 1,6fache erhöhte, wobei die Probenzahlen in den Monaten April bis Juni äußerst gering waren. Die Anzahl der serologisch tatsächlich auswertbaren Wildschweine ist im Zeitraum der 2. o.I. nur geringfügig um das 1,2fache angestiegen, da vermehrt Blutproben (bei 33% der Tiere) fehlten. Im Ergebnis der serologischen Untersuchungen haben sich die Antikörperprävalenzen von 43% nach der 1. o.I. auf knapp 51% im Anschluß an die 2. o.I. positiv entwickelt.

Tab. 7: Antikörperbefunde des Landkreises Güstrow von Januar bis Oktober 1995 (n. a. = nicht auswertbar)

	Gesamtzahl untersuchter Wildschweine	davon serologisch n. a.	Anzahl Ak-positiver Wildschweine	Anzahl Ak-negativer Wildschweine	% Ak-positive Wildschweine
Januar	17		1	16	5,9
Februar	34	4	17	13	56,7
März	5	1	4	0	100
<i>1. Immunisierung</i>	<i>56</i>	<i>5</i>	<i>22</i>	<i>29</i>	<i>43,1</i>
April	0				
Mai	3		1	2	33,3
Juni	2		1	1	50
Juli	15	6	5	4	55,5
August	29	7	9	13	40,9
September	19	10	6	3	66,7
Oktober	20	6	8	6	57,1
<i>2. Immunisierung</i>	<i>88</i>	<i>29</i>	<i>30</i>	<i>29</i>	<i>50,8</i>

Die Entwicklung der Antikörperprävalenzen in den drei Altersklassen Frischlinge, Überläufer und Adulte wird in Tabelle 8 gezeigt. Geringe Abweichungen zu den Angaben der vorangegangenen Tabelle resultieren daraus, daß Tiere, welcher keiner Altersklasse zugeordnet werden konnten, hier nicht mit aufgeführt sind, was in gleicher Weise auch für die nachfolgenden Auswertungen gilt.

In den Monaten der 1. o.I. (Januar bis März) differierten die Antikörperprävalenzen zwischen den Altersklassen nur geringfügig. In den Monaten April bis Juli der 2. o.I. ist beachtenswert, daß besonders wenig Frischlinge gestreckt wurden. Um diesen Aspekt, der epidemiologisch bedeutsam ist, herauszuarbeiten, wurde die 2. Immunisierungsperiode in der Tabelle 8 in zwei Abschnitte unterteilt. Besonders auffällig sind die Unterschiede bei den Antikörperprävalenzen in den Monaten August bis Oktober, in denen die Frischlingswerte deutlich unter 10% und die Überläuferwerte über 70% lagen. Der Anteil Ak-positiver Tiere unter den Adulten betrug in diesem Zeitraum sogar fast 90%.

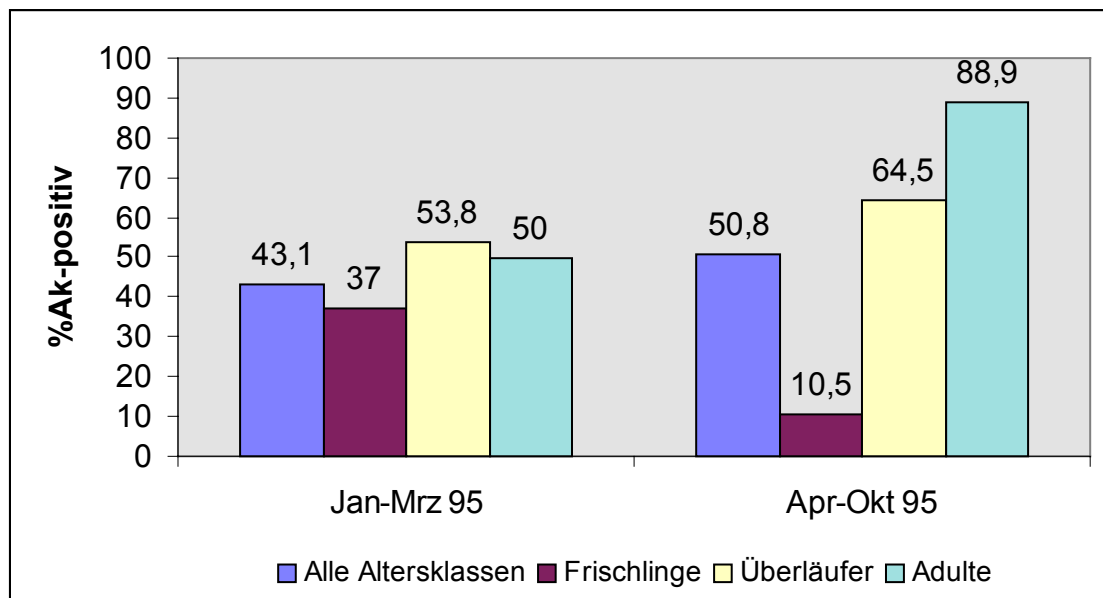
Tab. 8: Antikörperbefunde unter Berücksichtigung der Altersklassen im Landkreis Güstrow von Januar 1995 bis Oktober 1995

Altersklasse		Januar bis März 1995 (1. o.I.)	April bis Juli 1995 (2. o.I.)	August bis Oktober 1995 (2. o.I.)
Frischlinge	Anzahl absolut	27	3	16
	Anzahl Ak pos	10	1	1
	Ak pos %	37	33,3	6,25
Überläufer	Anzahl absolut	13	10	21
	Anzahl Ak pos	7	5	15
	Ak pos %	53,8	50	71,4
Adulte	Anzahl absolut	10	1	8
	Anzahl Ak pos	5	1	7
	Ak pos %	50		87,5

In Abbildung 3 werden die einzelnen Altersklassen im Vergleich zum Mittelwert der Antikörperprävalenzen aller erlegten Wildschweine der jeweiligen Immunisierungsperiode gezeigt, wobei die Daten den Tabellen 7 und 8 entnommen sind. In den Monaten Januar bis März ist die Streuung der Antikörperprävalenzen um den Mittelwert von 43% nur gering,

wohingegen für die Monate April bis Oktober beträchtliche Abweichungen zu verzeichnen sind. Es wird deutlich, daß bei einem Mittelwert von ca. 51% der Anteil der Antikörperträger bei den Frischlinge nach der 2. o.I. nur etwa 10% betrug, wohingegen von den Überläufern fast 65% und von den Alttieren fast 90% serologisch positiv reagierten.

Abb. 3: Darstellung der Antikörperentwicklung im Landkreis Güstrow von Januar bis Oktober 1995



Auswertung der 3. und 4. Immunisierungsperiode

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich, war nach der 3. o.I. ein starker Anstieg der Gesamtzahl untersuchter Wildschweine gegenüber dem gleichen Vorjahreszeitraum (vgl. Tabelle 7) zu verzeichnen. Allerdings war eine serologische Auswertung bei ca. 27% der Tiere nicht möglich (Blutproben fehlten). Mit einer Antikörperprävalenz von 56% in der Gesamtpopulation wurde in der 3. Immunisierungsperiode gegenüber der 2. ein leichter Zuwachs erreicht. In der 4. Immunisierungsperiode verminderte sich die Gesamtzahl untersuchter Wildschweine zwar um etwas mehr als die Hälfte gegenüber der 3. Immunisierungsperiode, nahm aber gegenüber dem Vorjahreszeitraum um das 1,6fache zu. Auch machten die serologisch nicht auswertbaren Proben nur noch ca. 16% aller beprobten Wildschweine aus. Nach der 4. o.I. fällt ein deutlicher Rückgang der Antikörperprävalenzen auf 35% auf. Dieser Wert liegt unterhalb der Antikörperprävalenzen aller drei vorangegangenen Immunisierungsperioden.

Tab. 9: Antikörperbefunde des Landkreises Güstrow von November 1995 bis Oktober 1996 (n. a. = nicht auswertbar)

	Gesamtzahl untersuchter Wildschweine	davon serologisch n.a.	Anzahl Ak-positiver Wildschweine	Anzahl Ak-negativer Wildschweine	% Ak-positive Wildschweine
November 95	50	9	26	15	63,4
Dezember	52	15	15	22	40,5
Januar 96	69	21	25	23	52,1
Februar	62	21	26	15	63,4
März	26	3	15	8	65,2
<i>3. Immunisierung</i>	<i>259</i>	<i>69</i>	<i>107</i>	<i>83</i>	<i>56,3</i>
April	2		0	2	
Mai	37	6	10	21	32,3
Juni	27	4	13	10	56,5
Juli	20	2	3	15	16,7
August	25	6	6	13	31,6
September	16	3	6	7	46,2
Oktober	14	1	4	9	30,8
<i>4. Immunisierung</i>	<i>141</i>	<i>22</i>	<i>42</i>	<i>77</i>	<i>35,3</i>

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich ist, waren in den Monaten nach der 3. o.I. die Antikörperprävalenzen bei den Frischlingen mit ca. 39% sehr ähnlich wie diejenigen nach der 1. o.I. (vgl. Tabelle 8). In den anderen Altersklassen setzte sich die Tendenz des Anstiegs gegenüber den vorherigen Immunisierungsperioden fort, und es wurden Anteile Ak-positiver Wildschweine von über 80% bei den Überläufern bzw. über 90% bei den Adulten ermittelt. Deutlicher noch als in den Monaten April bis Juli des Vorjahres fällt der geringe Anteil gestreckter Frischlinge auf. In der 4. Immunisierungsperiode betragen die Antikörperprävalenzen bei den Frischlingen ca. 9%, womit gleiche Ergebnisse wie in der 2. Immunisierungsperiode erreicht wurden (vgl. Tabelle 8). Bei den Überläufern und Adulten ist ein Rückgang der Ak-positiven Tiere eingetreten, der bei den Überläufern sehr drastisch ausfällt.

Tab. 10: Antikörperbefunde unter Berücksichtigung der Altersklassen im Landkreis Güstrow von November 1995 bis Oktober 1996

Altersklasse		November / Dezember 95 (3. o.I.)	Januar bis März 1996 (3. o.I.)	April bis Juli 1996 (4. o.I.)	August bis Oktober 96 4. o.I.)
Frischlinge	Anzahl absolut	51	62	7	25
	Anzahl Ak pos	16	28	0	3
	Ak pos %	31,4	45,2	0	12
Überläufer	Anzahl absolut	12	18	60	16
	Anzahl Ak pos	11	14	21	10
	Ak pos %	91,7	77,8	35	62,5
Adulte	Anzahl absolut	15	21	7	4
	Anzahl Ak pos	14	20	5	3
	Ak pos %	93,3	95,2	71,4	75

Abbildung 4 faßt einige Werte der Tabellen 9 und 10 zusammen und vergleicht die einzelnen Altersklassen mit dem Durchschnittswert der Gesamtpopulation. Die Antikörperprävalenzen der Frischlinge zeigen genau dasselbe Verhalten wie im Vorjahreszeitraum (vgl. Abbildung 3). Sehr auffällig ist hier der Rückgang der Ak-positiven Überläufer nach der 4. o.I. um die Hälfte gegenüber der 3. Immunisierungsperiode und der bei den Alttieren um mehr als 20%.

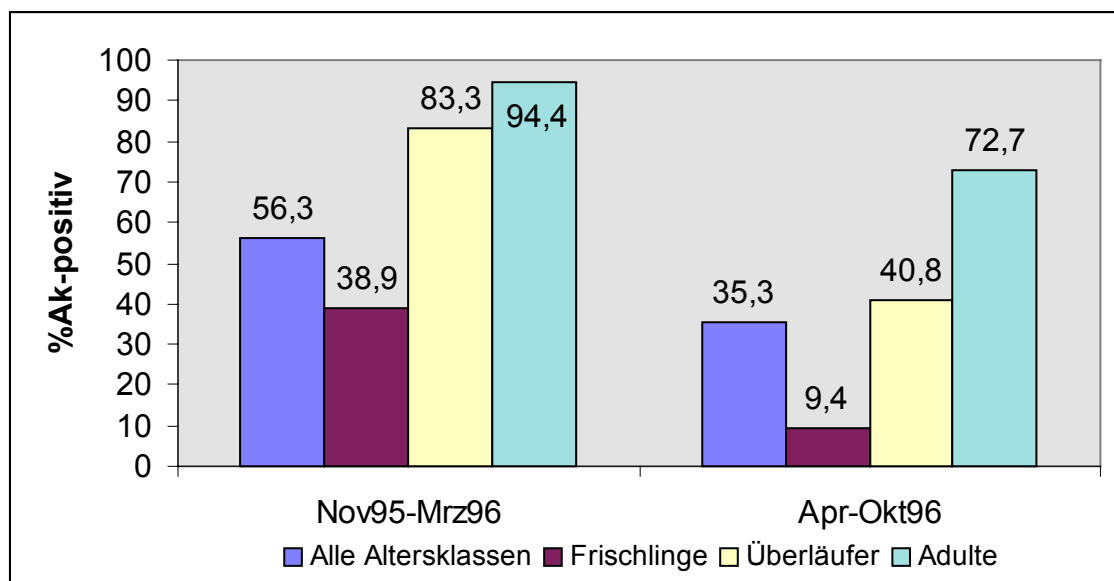
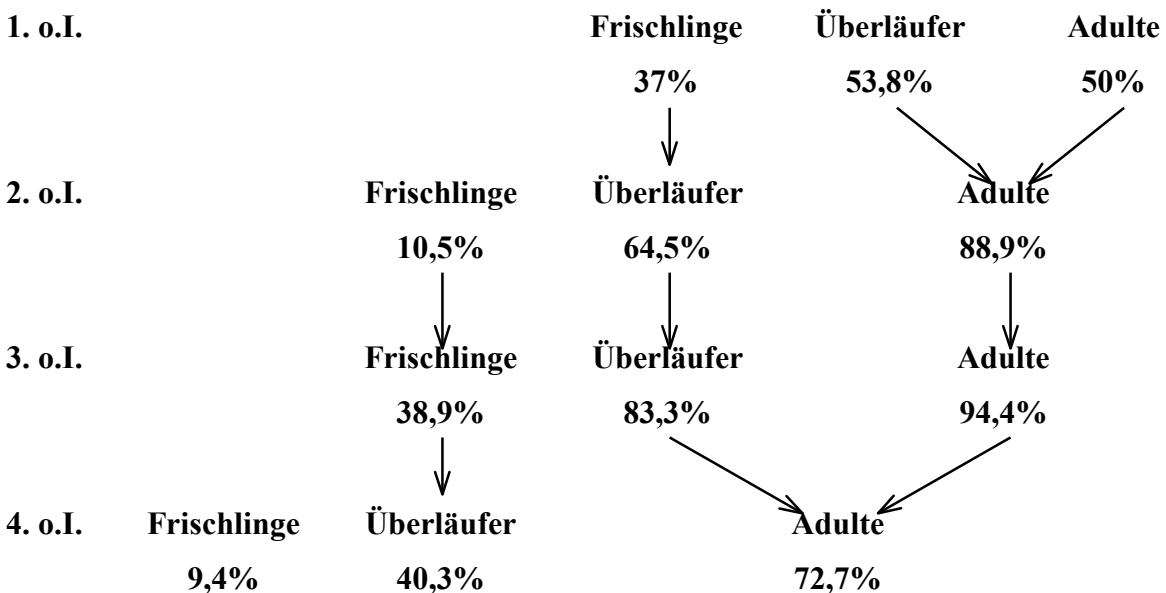


Abb. 4: Antikörperentwicklung im Landkreis Güstrow in den Monaten November 1995 bis Oktober 1996

Zusammenfassung

Bei näherer Betrachtung der Antikörperentwicklung in den drei Altersklassen findet man interessante Unterschiede sowie jahreszeitliche Schwankungen (vgl. Tabellen 8 und 10 sowie Abbildungen 3 und 4). Es zeigt sich, daß Überläufer und Alttiere stets hohe Antikörperprävalenzen aufwiesen. Ganz anders liegen die Verhältnisse bei den Frischlingen, bei denen in den Wintermonaten hohe und in den Sommermonaten sehr geringe Antikörperprävalenzen auftraten. Die Erklärung für diese Dynamik findet man zum großen Teil im Fortpflanzungsrhythmus des Schwarzwildes. In der Regel werden die Frischlinge in den Monaten Februar und März geboren. Mit deren Geburt werden dann die vorjährigen Tiere zu Überläufern und die zweijährigen zu Alttieren. Verfolgt man die Antikörperentwicklung unter dem Aspekt einer einheitlichen, immer älter werdenden Tiergruppe, so entsteht das der Abbildung 5 zu entnehmende Schema einer sich verändernden Population. Die neugeborenen Frischlinge starteten also mit einem sehr niedrigen Anteil von Antikörperträgern, erreichten dann aber nach der folgenden o.I. ca. 40%. Bis zur 3. Immunisierungsperiode war bei jeder Gruppe nach einer neuen o.I. eine Zunahme der Ak-positiven Tiere zu erkennen. Die 4. o.I. hatte allerdings auf die Antikörperentwicklung keinen positiven Einfluß.

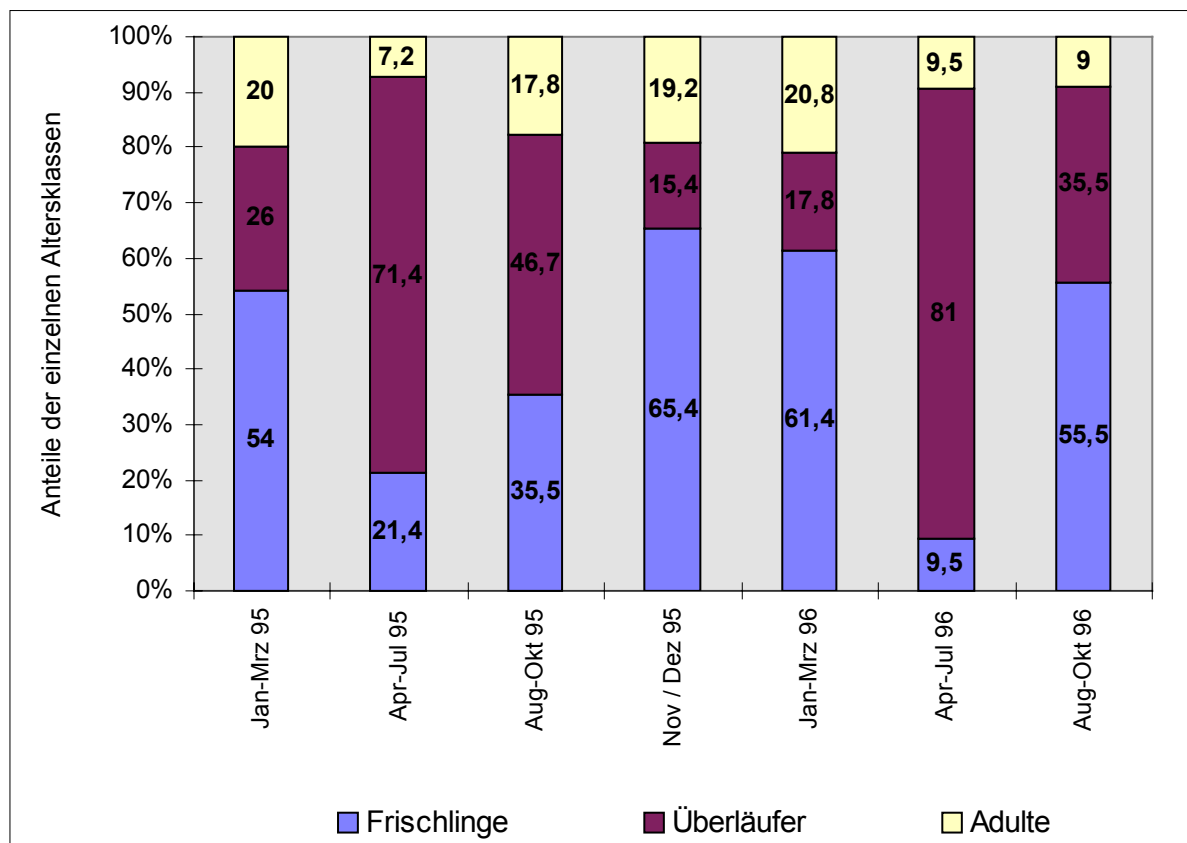
Abb. 5: Fließschema der Altersklassen mit dazugehörigem Anteil der KSPV-Ak-positiven Wildschweine (Landkreis Güstrow)



Die Abbildung 6 zeigt eine Übersicht von den Tabellen 8 und 10 entnommenen Daten, die die Verteilung der Alterstruktur widerspiegeln. Über den gesamten Zeitraum hinweg wurden

insgesamt 191 Frischlinge, 150 Überläufer und 66 Alttiere serologisch untersucht. Das ergibt einen Anteil von 46,9% Frischlingen, 36,9% Überläufern und 16,2% Alttieren. Auffallend sind die sehr niedrigen Frischlings- und außerordentlich hohen Überläuferanteile in den Monaten April bis Juli beider Jahre. Nur in den Wintermonaten 1995/1996 betrug die Frischlingsstrecke über 60% und die Überläuferstrecke ca. 15%. In mehreren Zeitabschnitten ist ein mit 20% hoher Anteil gestreckter Alttiere zu finden.

Abb. 6: Altersstruktur der erlegten Wildschweine im Landkreis Güstrow von Januar 1995 bis Oktober 1996



4.1.1.2. Landkreis Müritz

Auswertung der 1. und 2. Immunisierungsperiode

Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, war die Gesamtzahl zur Untersuchung eingesandter Wildschweine in der 1. und 2. Immunisierungsperiode in etwa gleich. Da aber in der 1. Immunisierungsperiode in größerem Umfang Blutproben fehlten, konnten in der 2. Immunisierungsperiode 30% mehr Tiere serologisch bewertet werden. Die Antikörperentwicklung von ca. 29% nach der 1. o.I. auf 44% nach der 2. o.I. zeigt insgesamt eine positive Tendenz. Dabei fällt auf, daß es nach einem starken Anstieg der Antikörperprävalenzen in den Sommermonaten zu einem Rückgang derselben im September und Oktober auf etwa die Werte nach der 1. o.I. kam.

Tab. 11: Antikörperbefunde im Landkreis Müritz in den Monaten Januar bis Oktober 1995 (n. a. = nicht auswertbar)

	Gesamtzahl untersuchter Wildschweine	davon serologisch n.a.	Anzahl Ak-positiver Wildschweine	Anzahl Ak-negativer Wildschweine	% Ak-positive Wildschweine
Januar	27		9	18	33,3
Februar	42	24	4	14	22,2
März	11		3	8	27,3
<i>1. Immunisierung</i>	<i>80</i>	<i>24</i>	<i>16</i>	<i>40</i>	<i>28,6</i>
April	0				
Mai	19		9	10	47,4
Juni	19		12	7	63,2
Juli	3		2	1	66,7
August	4		2	2	50
September	18	1	5	12	29,4
Oktober	10		2	8	20
<i>2. Immunisierung</i>	<i>73</i>	<i>1</i>	<i>32</i>	<i>40</i>	<i>44,4</i>

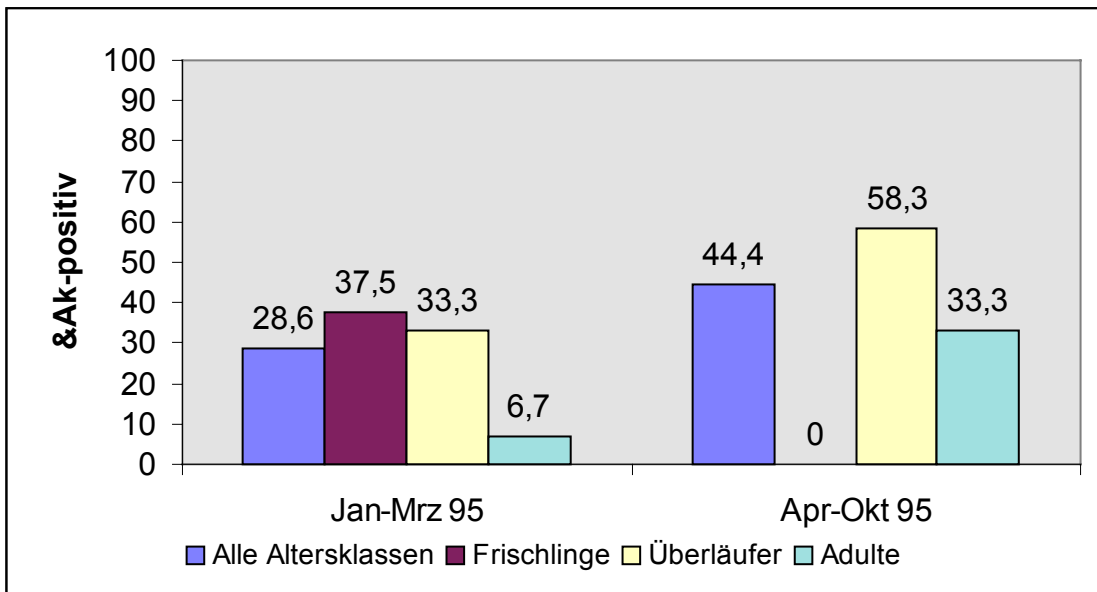
Aus Tabelle 12 wird deutlich, daß die Frischlinge nach der 1. o.I. mit 37% diejenige Altersklasse mit den meisten Ak-positiven Tieren stellten. Gefolgt wurden sie von den Überläufern, wohingegen bei den Alttieren nur sehr wenige Antikörper gegen KSPV auftraten. In der 2. Immunisierungsperiode ging der Rückgang der Antikörperbefunde im September und Oktober (vgl. Tabelle 11) hauptsächlich zu Lasten der Frischlingspopulation, in welcher über den gesamten Zeitraum hinweg kein Ak-positives Tier diagnostiziert wurde. Dabei war außerdem der Frischlingsanteil an der Gesamtstrecke sehr gering, wobei in den Monaten April bis Juli 1995 nur ein einziger Frischling erlegt wurde. Bei den Überläufern und Alttieren entwickelten sich die Antikörperprävalenzen insgesamt positiv. Die Schwankungen zwischen den beiden Abschnitten der 2. Immunisierungsperiode lassen sich mit dem geringen Probenumfang erklären.

Tab. 12: Antikörperbefunde unter Berücksichtigung der Altersklassen im Landkreis Müritz von Januar 1995 bis Oktober 1995

Altersklasse		Januar bis März 1995 (1. o.I.)	April bis Juli 1995 (2. o.I.)	August bis Oktober 1995 (2. o.I.)
Frischling	Anzahl absolut	32	1	11
	Anzahl Ak pos	12	0	0
	Ak pos %	37,5		0
Überläufer	Anzahl absolut	9	35	13
	Anzahl Ak pos	3	21	7
	Ak pos %	33,3	60	53,8
Adulte	Anzahl absolut	15	5	7
	Anzahl Ak pos	1	2	2
	Ak pos %	6,7	40	28,6

Zur Verdeutlichung einiger Daten aus den Tabellen 11 und 12 dient die Abbildung 7. Bei den Frischlingen sind ca. 37% nach der 1., aber kein Tier nach der 2. o.I. Ak-positiv. Es zeigt sich damit ein ganz ähnliches Verhalten der Antikörperentwicklung, wie es auch im LK Güstrow (vgl. Abbildung 3) zu beobachten war. Sowohl bei den Überläufern als auch bei den Alttieren ist nach der 2. o.I. gegenüber der 1. Immunisierungsperiode eine Zunahme des Anteil Ak-positiver Wildschweine um ca. 25% zu verzeichnen.

Abb. 7: Darstellung der Antikörperentwicklung im Landkreis Müritz von Januar bis Oktober 1995



Auswertung der 3. und 4. Immunisierungsperiode

Wie Tabelle 13 zu entnehmen ist, war die Gesamtzahl untersuchter Wildschweine in der 3. Immunisierungsperiode gegenüber der 2. (vgl. Tabelle 11) um ca. 40% gestiegen und änderte sich auch nicht wesentlich in der 4. Immunisierungsperiode. Der Anteil serologisch nicht auswertbarer Tiere betrug 7% in der 3. bzw. 8,5% in der 4. Immunisierungsperiode. Die Antikörperprävalenz in der Gesamtpopulation stagnierte nach der 3. o.I. mit 46% auf dem Niveau der 2. Immunisierungsperiode (vgl. Tabelle 11). Nach der 4. o.I. verhielt sie sich rückläufig und erreichte nur noch Werte von 35%, wobei die monatlichen Schwankungen außerordentlich groß waren und keinen Trend erkennen ließen.

Tab. 13: Antikörperbefunde des Landkreises Müritz für die Monate November 1995 bis Oktober 1996 (n. a. = nicht auswertbar)

	Gesamtzahl untersuchter Wildschweine	davon serologisch n.a.	Anzahl Ak-positiver Wildschweine	Anzahl Ak-negativer Wildschweine	% Ak-positiv Wildschweine
November 95	18	4	4	10	28,6
Dezember	17	1	6	10	37,5
Januar 96	23		14	9	60,9
Februar	34	4	16	14	53,3
März	13		4	9	30,8
<i>3. Immunisierung</i>	<i>105</i>	<i>9</i>	<i>44</i>	<i>52</i>	<i>45,8</i>
April	0				
Mai	20		9	11	45
Juni	20	4	11	5	68,75
Juli	14		2	12	14,3
August	21	2	2	17	10,5
September	18	2	9	7	56,25
Oktober	18		3	15	16,7
<i>4. Immunisierung</i>	<i>111</i>	<i>8</i>	<i>36</i>	<i>67</i>	<i>35</i>

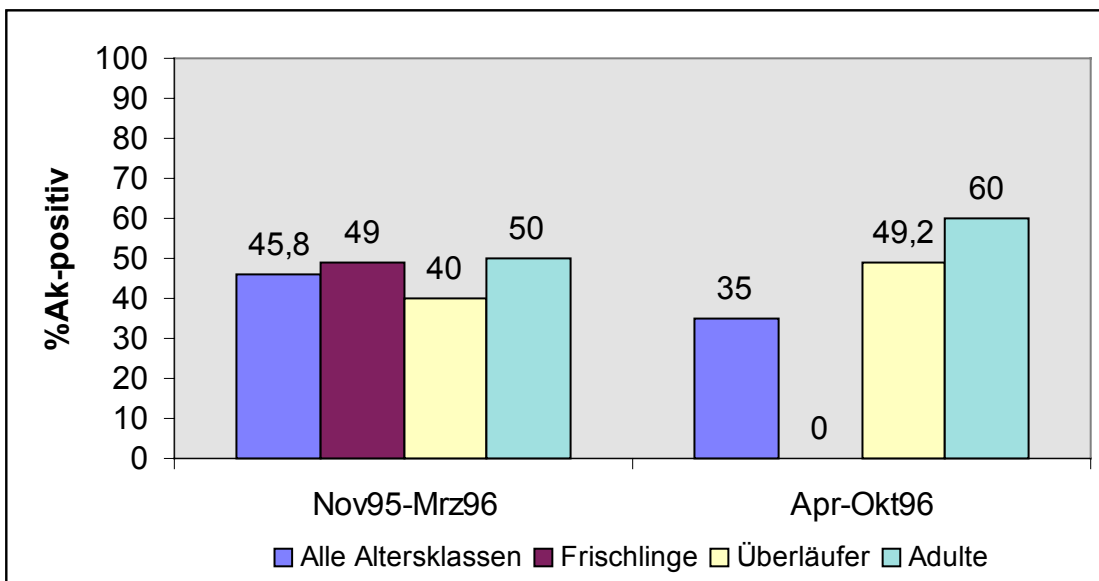
Die Auswertung der Antikörperbefunde nach Altersklassen in der Tabelle 14 läßt erkennen, daß nach zunächst hohen Anteilen Ak-positiver Frischlinge in den Monaten November 1995 bis März 1996 (35% bzw. ca. 60%) im folgenden Zeitabschnitt von April bis Oktober 1996 bei keinem Frischling Antikörper vorgefunden wurden. Dabei war die Anzahl gestreckter Frischlinge in der 4. Immunisierungsperiode gegenüber dem gleichen Vorjahreszeitraum etwas erhöht (vgl. Tabelle 12). Die Antikörperprävalenzen bei den Überläufern bewegten sich auch bei der vorgenommenen Unterteilung der beiden Immunisierungsperioden auf sehr einheitlichem Niveau, wogegen bei den Alttieren aufgrund der geringen Tierzahlen daraus keine verwertbare Aussage abgeleitet werden kann.

Tab. 14: Antikörperbefunde unter Berücksichtigung der Altersklassen im Landkreis Müritz von November 1995 bis Oktober 1996

Altersklasse		November / Dezember 95 (3. o.I.)	Januar bis März 1996 (3. o.I.)	April bis Juli 1996 (4. o.I.)	August bis Oktober 96 (4. o.I.)
Frischlinge	Anzahl absolut	20	29	10	22
	Anzahl Ak pos	7	17	0	0
	Ak pos %	35	58,6	0	0
Überläufer	Anzahl absolut	4	21	36	29
	Anzahl Ak pos	2	8	20	12
	Ak pos %	50	38,1	55,6	41,4
Adulte	Anzahl absolut	7	3	3	2
	Anzahl Ak pos	2	3	1	2
	Ak pos %	28,6	100	33,3	100

In Abbildung 8 faßt die wichtigsten Daten der Tabellen 13 und 14 zusammen. Es wird offensichtlich, daß der Rückgang der Antikörperprävalenz in der Gesamtpopulation nach der 4. o.I. dadurch zustande kommt, daß kein einziger Frischling Antikörperträger war. Dagegen nahm der Anteil serologisch positiver Überläufer und Alttiere um jeweils ca. 10 % zu.

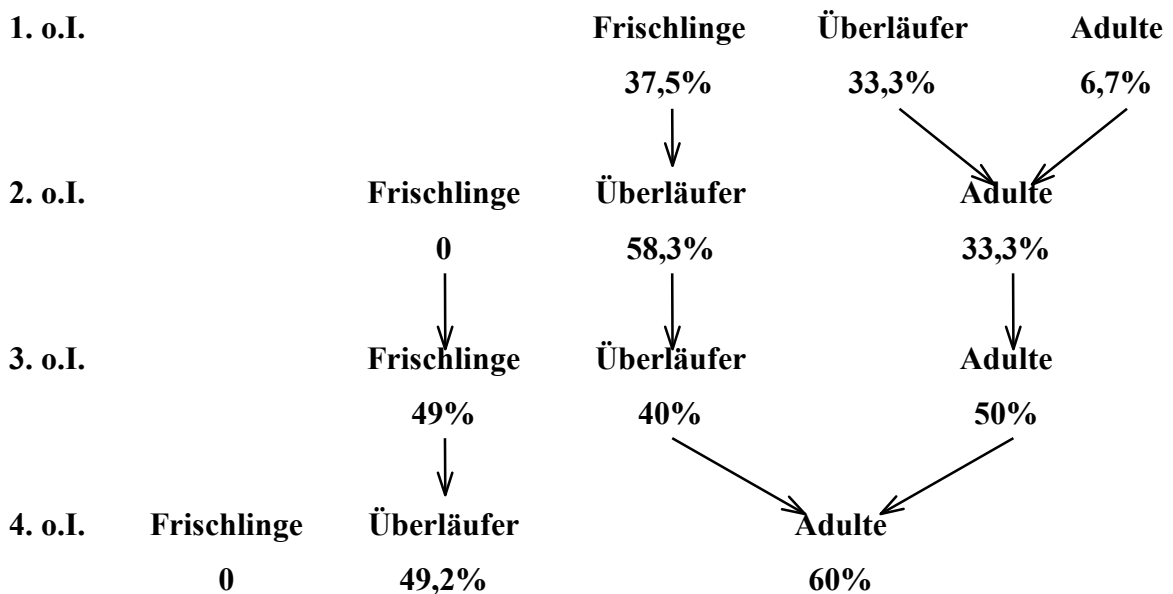
Abb. 8: Darstellung der Antikörperentwicklung im Landkreis Müritz von November 1995 bis Oktober 1996



Zusammenfassung

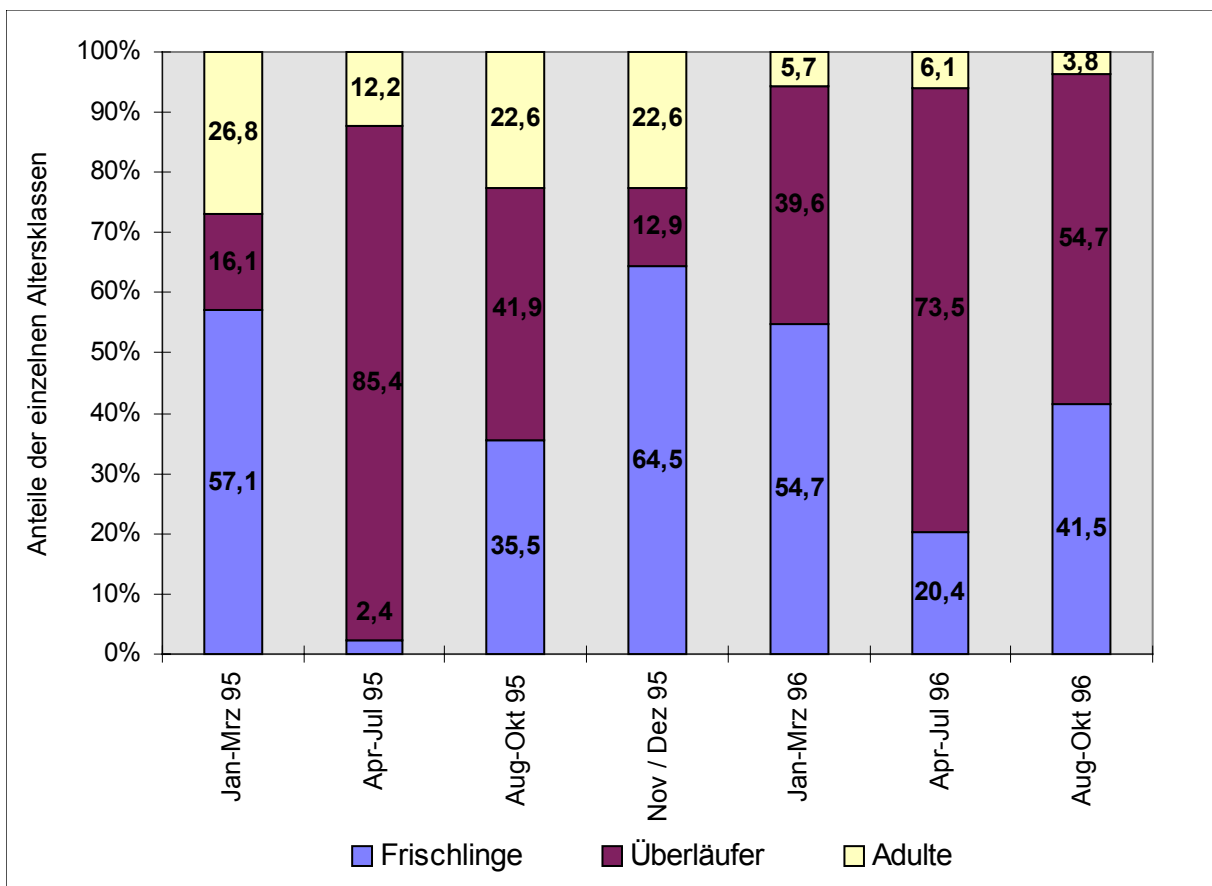
In der Abbildung 9 werden die Tiergruppen in ihrer Entwicklung von Frischlingen zu Überläufern und Alttieren betrachtet. Die Angaben basieren auf den Werten der Tabellen 12 und 14 (vgl. auch Abbildungen 7 und 8). Unter den neugeborenen Frischlingen der 2. und 4. IP fanden sich in deren erstem Lebenshalbjahr noch keine Antikörperträger. Dagegen betragen im zweiten Lebenshalbjahr nach einer erneuten o.I. die Antikörperprävalenzen unter den Frischlingen knapp 40% bzw. knapp 50%. Ein Rückgang des Anteils serologisch positiver Überläufer ist nach der 3. o.I. zu sehen, wobei hier mit 25 Tieren auch keine große Probenzahl vorlag (vgl. Tabelle 14). Der insgesamt positive Trend geriet bei den Überläufern der 4. Immunisierungsperiode ins Stocken, verstärkte sich aber bei den Alttieren.

Abb. 9: Fließschema der Altersklassen mit dazugehörigem Anteil der KSPV-Ak-positiven Wildschweine (Landkreis Müritz)



Die der Abbildung 10 zugrunde liegenden Werte sind den Tabellen 12 und 14 entnommen. Im LK Müritz waren über alle vier Immunisierungsperioden hinweg die Altersklassen wie folgt verteilt: 125 Frischlinge (39,8%), 147 Überläufer (46,8%) und 42 Alttiere (13,4%). Auffallend niedrig mit nur 2% ist der Frischlingsanteil in den Monaten April bis Juli 1995, während er in den gleichen Monaten des folgenden Jahres 20% beträgt. Dagegen machen die Frischlinge in den Wintermonaten mit Werten zwischen 55 und 65% den Hauptanteil aller erlegten Wildschweine aus. Weiterhin ist bemerkenswert, daß der Anteil gestreckter Alttiere 1996 deutlich niedriger war als 1995.

Abb. 10: Altersstruktur der erlegten Wildschweine im Landkreis Müritz von Januar 1995 bis Oktober 1996



4.1.1.3. Landkreis Ostvorpommern

Auswertung der 1. und 2. Immunisierungsperiode

Aus den Angaben in Tabelle 15 geht hervor, daß sich die Gesamtzahl an untersuchten Wildschweinen in der 2. Immunisierungsperiode gegenüber der 1. verdreifacht hat. Dabei waren jeweils nur sehr wenige Tiere aufgrund fehlenden Blutes serologisch nicht auswertbar. Von 35% Ak-positiver Wildschweine in der 1. Immunisierungsperiode stiegen die Werte nach der 2. o.I. auf 40% an. Dabei wurden zwischenzeitlich im Juni und Juli Antikörperprävalenzen von etwa 60% erreicht, die aber in den Folgemonaten eine stark rückläufige Tendenz aufwiesen mit nur 30% Ak-positiver Wildschweine im Oktober.

Tab. 15: Antikörperbefunde des Landkreises Ostvorpommern von Januar bis Oktober 1995 (n. a. = nicht auswertbar)

	Gesamtzahl untersuchter Wildschweine	davon serologisch n.a.	Anzahl Ak-positiver Wildschweine	Anzahl Ak-negativer Wildschweine	% Ak-positive Wildschweine
Januar	5		0	5	0
Februar	87	3	26	58	31
März	52		24	28	46,2
<i>1. Immunisierung</i>	<i>144</i>	<i>3</i>	<i>50</i>	<i>91</i>	<i>35,5</i>
April	23	2	9	12	42,9
Mai	97	1	33	63	34,4
Juni	57	3	31	23	57,4
Juli	20	3	11	6	64,7
August	88	2	39	47	39,2
September	83	2	28	53	34,6
Oktober	65	2	18	45	28,6
<i>2. Immunisierung</i>	<i>433</i>	<i>15</i>	<i>169</i>	<i>249</i>	<i>40,4</i>

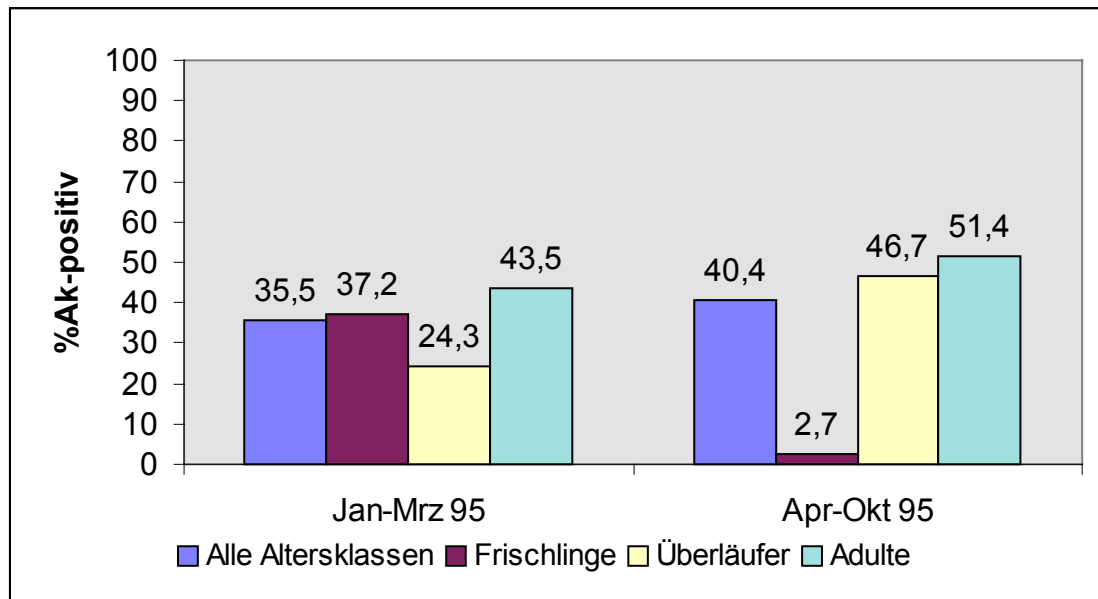
Wie der Tabelle 16 zu entnehmen ist, war die Anzahl untersuchter Frischlinge trotz stark gestiegener Gesamtanzahl untersuchter Wildschweine (vgl. Tabelle 15) in der 1. und 2. Immunisierungsperiode etwa gleich. Auffällig ist, daß von April bis Juli kein Frischling erlegt wurde. Große Unterschiede sind im Anteil Ak-positiver Frischlinge mit 37% nach der 1. o.I. und nur knapp 3% nach der 2. o.I. zu verzeichnen. Die Antikörperprävalenzen bei den Überläufern wiesen eine stetige Zunahme von 24% nach der 1. o.I. auf 53% in den Monaten August bis Oktober nach der 2. o.I. auf. Der Anteil Ak-positiver Alttiere stieg schon in den ersten Monaten nach der 2. o.I. um ca. 10% gegenüber der 1. Immunisierungsperiode an.

Tab. 16: Antikörperbefunde unter Berücksichtigung der Altersklassen im Landkreis Ostvorpommern von Januar 1995 bis Oktober 1995

Altersklasse		Januar bis März 1995 (1. o.I.)	April bis Juli 1995 (2. o.I.)	August bis Oktober 1995 (2. o.I.)
Frischling	Anzahl absolut	78	0	73
	Anzahl Ak pos	29		2
	Ak pos %	37,2		2,7
Überläufer	Anzahl absolut	37	149	110
	Anzahl Ak pos	9	63	58
	Ak pos %	24,3	42,3	52,7
Adulte	Anzahl absolut	23	32	40
	Anzahl Ak pos	10	17	20
	Ak pos %	43,5	53,1	50

Der Abbildung 11 liegen die wichtigsten Daten aus den Tabellen 15 und 16 zugrunde. Der insgesamt leicht positive Trend der Antikörperentwicklung wurde durch die starke Zunahme der Ak-positiven Überläufer um ca. 20% und die ebenfalls noch deutliche Zunahme Ak-positiver Alttiere um 8% verursacht. Die Frischlingspopulation entwickelte sich demgegenüber stark rückläufig von 37% auf knapp 3% Ak-positiver Tiere.

Abb. 11: Darstellung der Antikörperentwicklung im Landkreis Ostvorpommern von Januar bis Oktober 1995



Auswertung der 3. und 4. Immunisierungsperiode

Die in der Tabelle 17 aufgeführte Gesamtanzahl untersuchter Wildschweine sowie die Anzahl serologisch nicht auswertbarer Tiere blieben gegenüber der 2. Immunisierungsperiode (vgl. Tabelle 15) nach der 3. und 4. o.I. ziemlich konstant. Die Antikörperbefunde fielen dagegen deutlich unter ihr vorheriges Niveau. Nach der 3. o.I. betrug der Anteil serologisch positiver Wildschweine 27% und nach der 4. o.I. sogar nur noch 23%, wobei nach dem Anstieg der Antikörperprävalenzen im Juni auf über 40% in den Monaten Juli bis Oktober eine rückläufige Tendenz auf etwa 20% zu beobachten war.

Tab. 17: Antikörperbefunde des Landkreises Ostvorpommern von November 1995 bis Oktober 1996 (n. a. = nicht auswertbar)

	Gesamtzahl untersuchter Wildschweine	davon serologisch n.a.	Anzahl Ak-positiver Wildschweine	Anzahl Ak-negativer Wildschweine	% Ak-positive Wildschweine
November 95	112	2	22	88	20
Dezember	98	1	29	68	29,9
Januar 96	84	2	29	53	35,4
Februar	82	2	22	58	27,5
März	44	5	7	32	17,9
<i>3. Immunisierung</i>	<i>420</i>	<i>12</i>	<i>109</i>	<i>299</i>	<i>26,7</i>
April	16		1	15	6,25
Mai	80	4	22	54	28,9
Juni	58	3	24	31	43,6
Juli	68	1	10	57	14,9
August	71		13	58	18,3
September	75	1	15	59	20,3
Oktober	67	3	12	52	18,75
<i>4. Immunisierung</i>	<i>435</i>	<i>12</i>	<i>97</i>	<i>326</i>	<i>22,9</i>

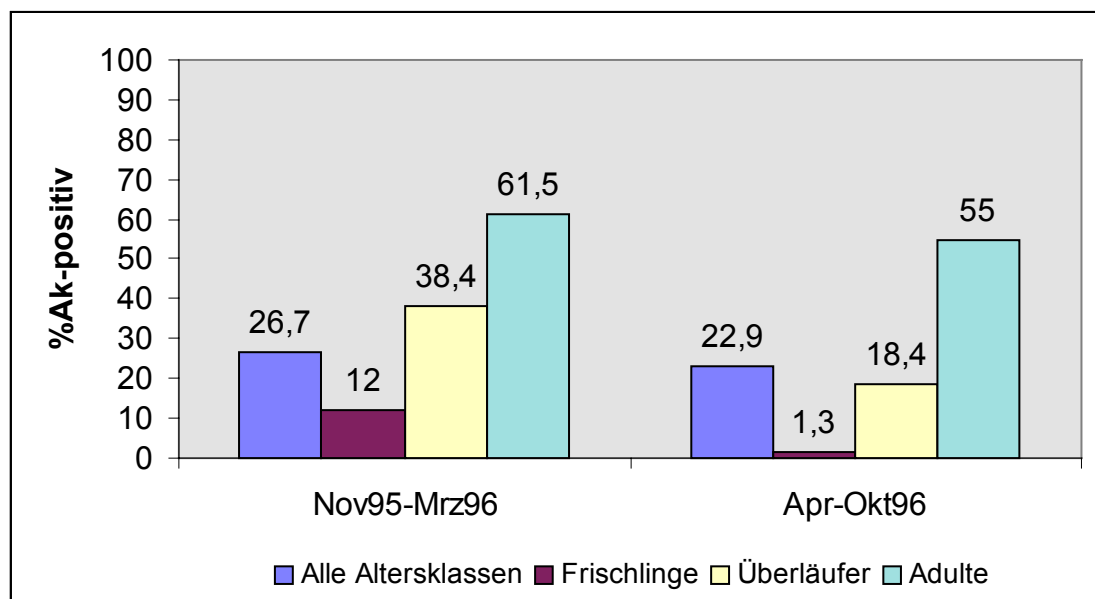
Tabelle 18 zeigt, welche Altersklassen hauptsächlich für die negative Antikörperentwicklung verantwortlich sind (vgl. Tabelle 17). Es fallen zunächst die geringen Tierzahlen in den Monaten April bis Juli in der Altersklasse der Frischlinge auf. Neben den Frischlingen, die sowohl nach der 3. als auch nach der 4. o.I. nur in geringem Umfang mit Antikörperbildung reagierten, war bei den Überläufern eine stetige Abnahme der Ak-positiven Tiere um letztlich ca. 30% zu registrieren. Lediglich die Alttiere verblieben in ihren Antikörperprävalenzen in den betrachteten Zeiträumen auf einem gleichbleibenden Niveau und konnten sich gegenüber der 2. Immunisierungsperiode (vgl. Tabelle 16) sogar verbessern.

Tab. 18: Antikörperbefunde unter Berücksichtigung der Altersklassen im Landkreis Ostvorpommern von November 1995 bis Oktober 1996

Altersklasse		November / Dezember 95 (3. o.I.)	Januar bis März 1996 (3. o.I.)	April bis Juli 1996 (4. o.I.)	August bis Oktober 96 (4. o.I.)
Frischlinge	Anzahl absolut	113	137	14	65
	Anzahl Ak pos	8	22	0	1
	Ak pos %	7,1	16,1	0	1,5
Überläufer	Anzahl absolut	45	28	163	92
	Anzahl Ak pos	18	10	35	12
	Ak pos %	40	35,7	21,5	13
Adulte	Anzahl absolut	49	29	37	52
	Anzahl Ak pos	25	23	22	27
	Ak pos %	51	79,3	59,5	51,9

In der nachfolgenden Abbildung 12 sind die wesentlichsten Daten der Tabellen 17 und 18 zusammengestellt. Die Grafik verdeutlicht noch einmal den negativen Trend in der Antikörperentwicklung nicht nur bei den Frischlingen, sondern besonders drastisch auch bei den Überläufern. Nur gering fiel dagegen die Abnahme bei den Alttiere mit ca. 6% aus.

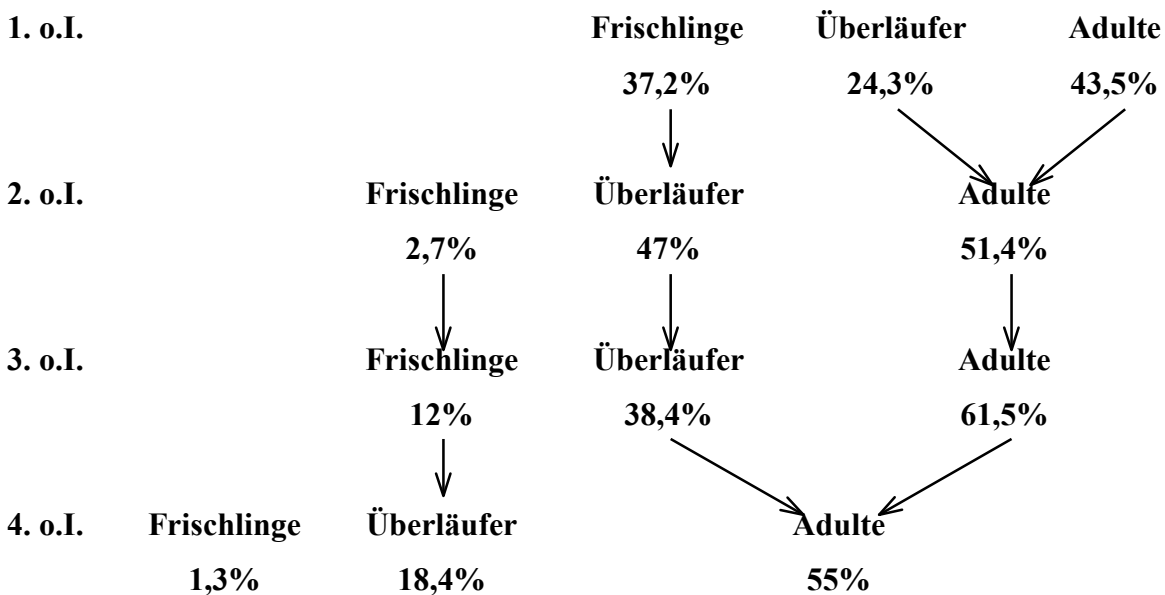
Abb. 12: Darstellung der Antikörperentwicklung im Landkreis Ostvorpommern von November 1995 bis Oktober 1996



Zusammenfassung

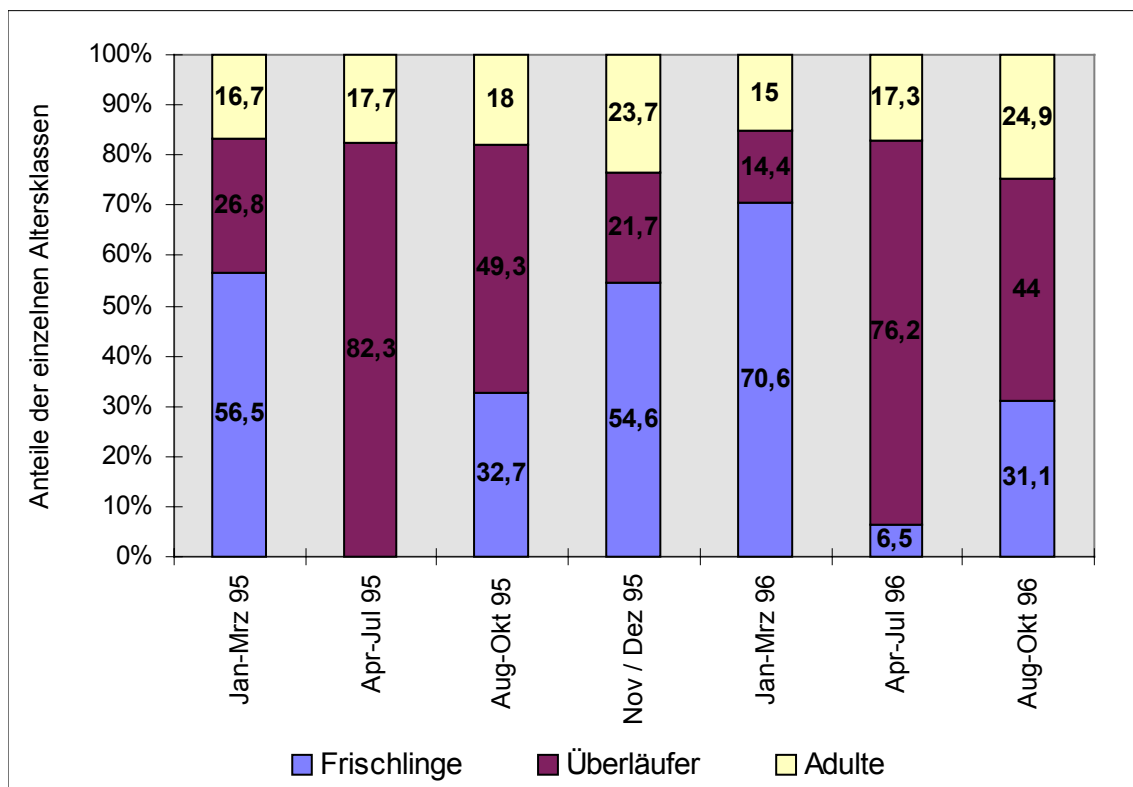
Den Angaben in der Abbildung 13 liegen Werte aus den Tabellen 16 und 18 zugrunde (vgl. auch Abbildungen 11 und 12). Bei der hier dargestellten Art der Betrachtung fällt auf, daß sich diejenigen Wildschweine, die schon zur Zeit der 1. o.I. lebten, in ihren Antikörperbefunden insgesamt positiv entwickelten. Allerdings muß nach der 3. o.I. eine rückläufige Tendenz bei den Überläufern verzeichnet werden. Dies zeigte wiederum negative Auswirkungen auf die Antikörperprävalenzen bei den Adulten nach der 4. o.I., welche ganz offensichtlich ohne den gewünschten Erfolg blieb. Die neugeborenen Frischlinge der 2. Immunisierungsperiode zeigten auch nach der 3. o.I., in der sie sich in ihrem zweiten Lebenshalbjahr befanden, nur eine äußerst geringe Zunahme an Antikörperträgern von 10%. Ebenfalls als nahezu wirkungslos erwies sich die 4. o.I., in deren Anschluß die Antikörperprävalenz in der erwähnten Tiergruppe nur um 6% anstieg.

Abb. 13: Fließschema der Altersklassen mit dazugehörigem Anteil der KSPV-Ak-positiven Wildschweine (Landkreis OVP)



Die in Abbildung 14 dargestellte Altersverteilung basiert auf den Werten der Tabellen 16 und 18. Die Anteile der einzelnen Altersklassen an den insgesamt gestreckten Wildschweinen betragen im LK Ostvorpommern für alle vier Immunisierungsperioden 35,1% (480) Frischlinge, 45,7% (624) Überläufer und 19,2% (262) Alttiere. Der Abschub der Frischlinge unterlag beträchtlichen jahreszeitlichen Schwankungen. Nachdem in den Monaten April bis Juli kein oder so gut wie kein Frischling zur Strecke gebracht wurde, stieg deren Anteil in den Folgemonaten kontinuierlich an und erreichte in den Monaten Januar bis März über 70% der Gesamtstrecke. Das ändert aber nichts an der Tatsache, daß der Überläuferanteil, obwohl 1996 leicht rückläufig zugunsten des Frischlingsanteils, ausgesprochen hoch ist. Ebenfalls ist zu bemerken, daß sehr stark Alttiere gestreckt wurden. Ihr Anteil betrug mindestens 15% und in zwei Zeiträumen sogar fast 25% an der Gesamtstrecke.

Abb. 14: Altersstruktur der erlegten Wildschweine im Landkreis Ostvorpommern von Januar 1995 bis Oktober 1996

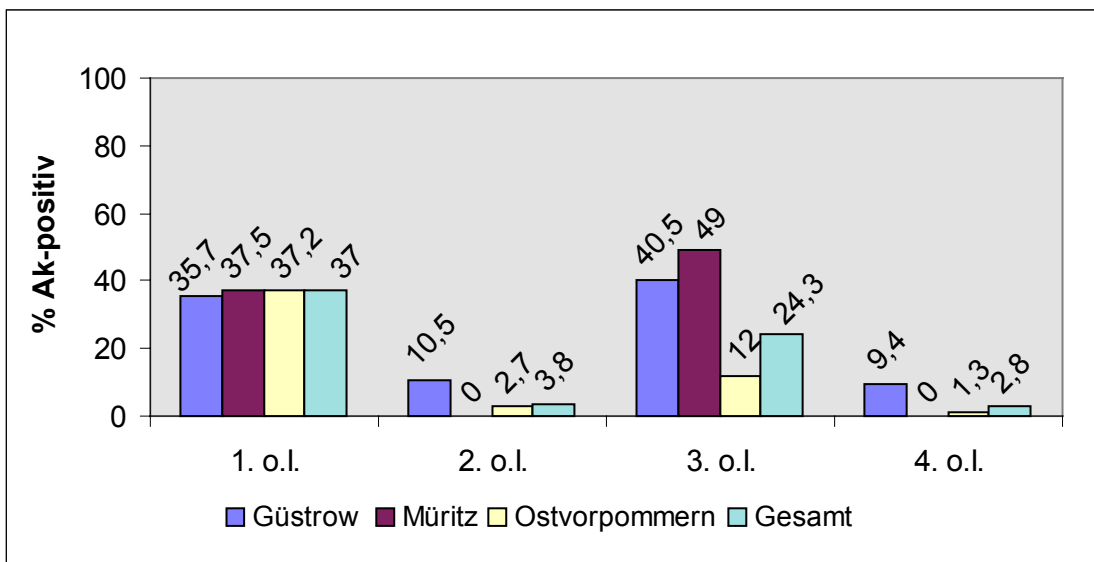


4.1.1.4. Zusammenfassung nach Untersuchungsgebieten und Altersklassen

Den folgenden Abbildungen 15 bis 17 liegen jeweils Daten aus den Tabellen 8, 10, 12, 14, 16 und 18 zugrunde. Die hier dargestellten Werte finden sich in anderer Zusammenstellung auch in den Abbildungen 3, 4, 7, 8, 11 und 12.

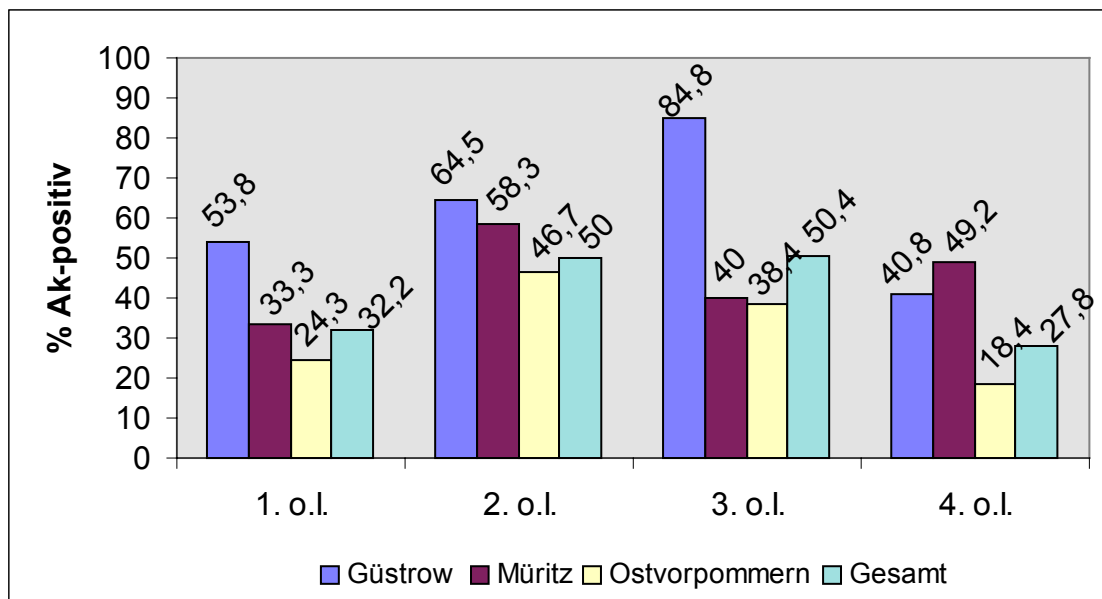
Aus der Abbildung 15, in welcher die Frischlingsklassen der drei Landkreise miteinander verglichen werden, wird die schon mehrfach angesprochene Dynamik deutlich. Nach der 1. o.I. lagen die Antikörperprävalenzen in allen drei Landkreisen sehr einheitlich bei knapp unter 40%. Auch der Rückgang serologisch positiver Frischlinge nach der 2. o.I. erfolgte bei allen Landkreisen in gleicher Weise. Danach folgte in den LK Güstrow und Müritz nach der 3. o.I. eine Zunahme der Ak-positiven Frischlinge auf Werte, die ca. 5 bzw. 11 Prozentpunkte über denen der 1. Immunisierungsperiode lagen. Im LK Ostvorpommern dagegen konnten mit nur 12% Ak-positiver Frischlinge die Vorgaben des gleichen Vorjahreszeitraumes nicht annähernd erreicht werden. Die Dynamik der allgemeinen Abnahme positiver Antikörperbefunde in den Frühjahrs- und Sommermonaten ist auch nach der 4. o.I. deutlich erkennbar. Die höchsten Antikörperprävalenzen in der 2. und 4. Immunisierungsperiode weisen mit ca. 10% die Frischlinge des LK Güstrow auf.

Abb. 15: KSPV-Antikörperprävalenzen in der Altersklasse der Frischlinge



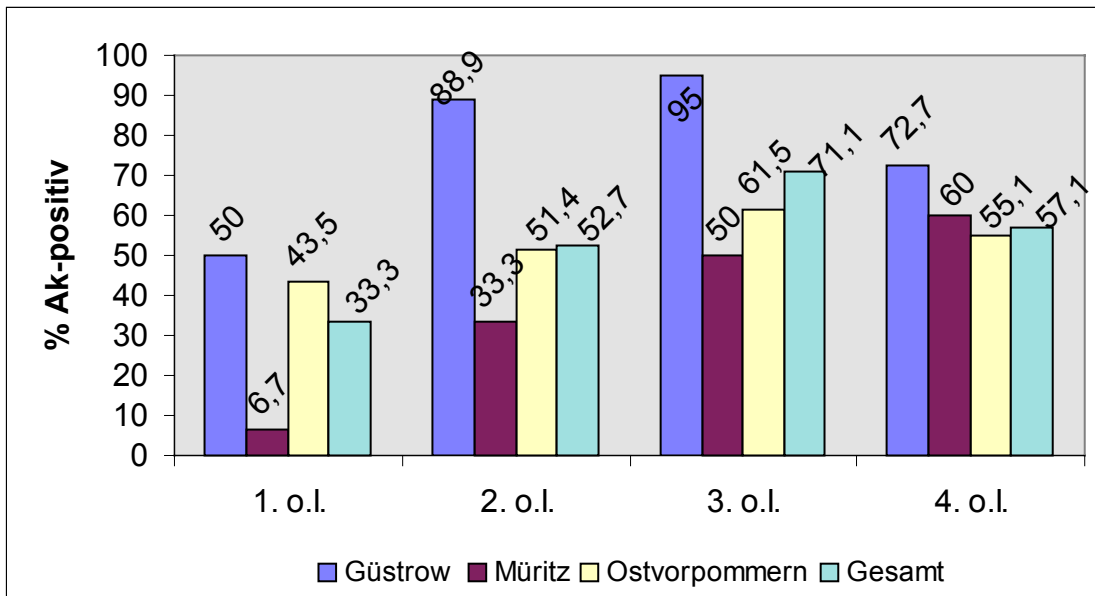
Die Abbildung 16 zeigt die Antikörperentwicklung in den Überläuferklassen. Nachdem die Überläufer nach der 1. o.I. in den LK Müritz und Ostvorpommern mit ihren Antikörperprävalenzen hinter den Frischlingen zurückblieben, war nach der 2. o.I. eine starke Zunahme Ak-positiver Tiere zu beobachten. Diese betrug für den LK Güstrow etwa 10, für den LK Müritz 25 und für den LK Ostvorpommern ca. 22 Prozentpunkte. Nach der 3. o.I. verläuft die Antikörperentwicklung nur noch im LK Güstrow mit einer Zunahme von nochmals 20 Prozentpunkte weiter positiv. Im LK Müritz gingen die positiven Antikörperbefunde um 18, im LK Ostvorpommern um 8 Prozentpunkte zurück. Nach der 4. o.I. muß beachtet werden, daß die Überläuferklasse jetzt nicht mehr mit der der 3. Immunisierungsperiode identisch war, sondern sich aus den ehemaligen Frischlingen der 2. und 3. Immunisierungsperiode zusammensetzte. Deshalb konnte sich auch der Anteil Ak-positiver Überläufer im LK Güstrow gegenüber der vorhergegangenen o.I. halbieren. Die Überläufer des LK Müritz legten zwar um 9 Prozentpunkte zu, im Vergleich zu den Frischlingen der 3. Immunisierungsperiode stagnieren die Werte allerdings. Deutlich rückläufig verhielten sich mit einem Minus von 20 Prozentpunkten auch die Antikörperprävalenzen im LK Ostvorpommern, wobei im Vergleich mit den Frischlingen der 3. Immunisierungsperiode immerhin ein leichter Zugewinn von 6 Prozentpunkten erkennbar war.

Abb. 16: KSPV-Antikörperprävalenzen in der Altersklasse der Überläufer



Der Trend bei den Alttieren, der aus Abbildung 17 ersichtlich ist, verlief recht eindeutig in Richtung einer stetigen Zunahme der Antikörperprävalenzen. Auffallend hoch waren die Anteile serologisch positiver Alttiere nach der 2. und 3. o.I. im LK Güstrow. In der 4. Immunisierungsperiode waren sie rückläufig mit einem Minus von 20 Prozentpunkten. Im LK Müritz war eine langsame, aber beständige Zunahme Ak-positiver Alttiere von nur 7% nach der 1. o.I. auf 60% nach der 4. o.I. zu beobachten. In der Alttierpopulation des LK Ostvorpommern stieg die Antikörperprävalenz während der ersten drei Immunisierungsperioden kontinuierlich an. Nach der 4. o.I. zeigte sich ein leichter Rückgang um 6 Prozentpunkte.

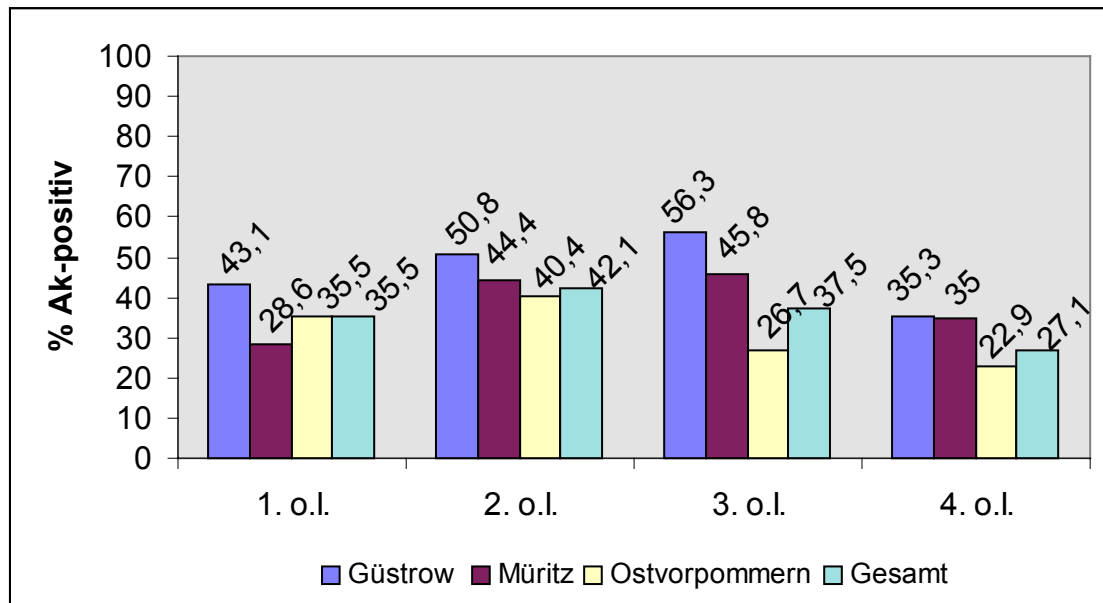
Abb. 17: KSPV-Antikörperprävalenzen in der Altersklasse der Adulten



Einen Überblick über den allgemeinen, altersklassenunabhängigen Trend der Antikörperentwicklung liefert die Abbildung 18. Die zugrundeliegenden Daten entstammen den Tabellen 7, 9, 11, 13, 15 und 17.

In den LK Güstrow und Müritz verlief die Entwicklung bis nach der 3. o.I. positiv. Dagegen mußte im LK Ostvorpommern schon in der 3. Immunisierungsperiode ein Rückgang der positiven Antikörperbefunde registriert werden, welcher in der 4. Immunisierungsperiode auch für die LK Güstrow und Müritz folgte.

Abb. 18: KSPV-Antikörperprävalenzen aller Altersklassen



4.1.2. Wiederfindung des Markers Oxytetracyclin (OTC)

Von insgesamt 2213 auswertbaren Wildschweinen aller drei Untersuchungsgebiete waren 351 OTC-positiv (15,8%), 526 fraglich (23,8%) und 1336 OTC-negativ (60,4%). Die Ergebnisse des Nachweises von OTC im Knochen der untersuchten Wildschweine sind in den folgenden Abschnitten in Bezug auf die einzelnen Immunisierungsperioden getrennt nach Untersuchungsgebieten dargestellt.

4.1.2.1. Korrelation der Ergebnisse mit den Antikörperbefunden

4.1.2.1.1. Landkreis Güstrow

In der Tabelle 19 sind die Antikörper- und OTC-Ergebnisse einander gegenübergestellt. Insgesamt wurden in der 1. Immunisierungsperiode 54 Wildschweine auf OTC untersucht, nach der 2. o.I. 82, nach der 3. o.I. 228 und in der 4. Immunisierungsperiode 138. Es fällt auf, daß in allen Immunisierungsperioden die meisten Wildschweine OTC-negativ waren. In allen Immunisierungsperioden wurden „fragliche“ Tiere gefunden, d.h., diese konnten auch nach wiederholter Untersuchung nicht eindeutig bewertet werden. Für einen Teil der untersuchten Wildschweine konnte der Antikörperstatus aufgrund fehlenden Blutes nicht ermittelt werden.

Tab. 19: Vergleich der Antikörper- mit den Oxytetracyclinergebnissen des Landkreises Güstrow (n. a. = nicht auswertbar)

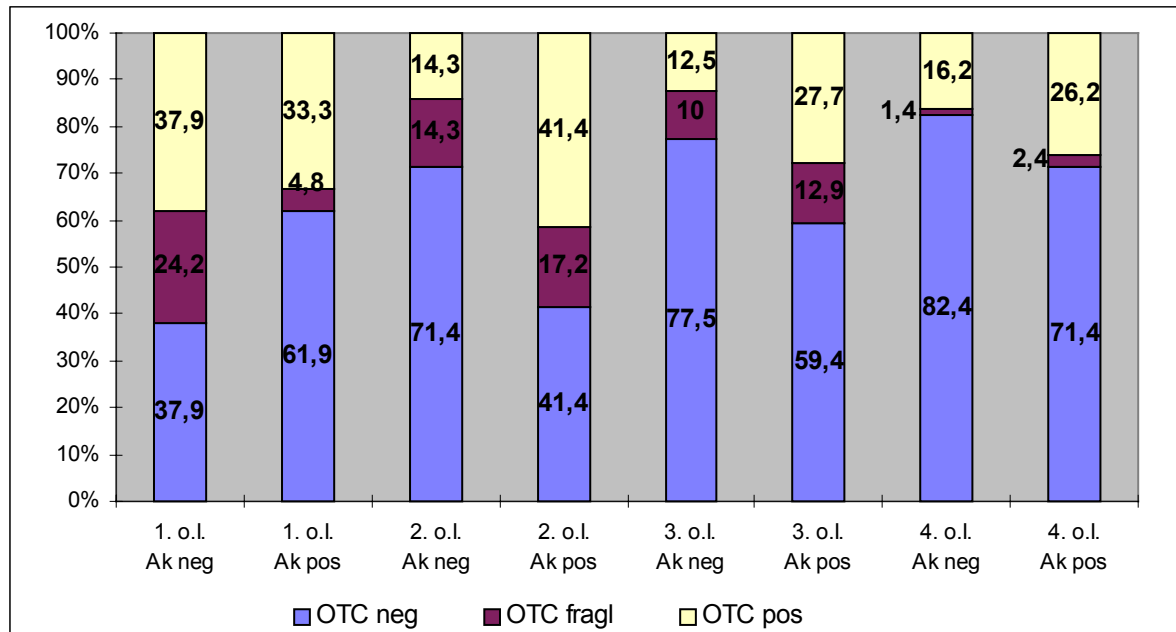
1. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	11	7	11
pos	13	1	7
n.a.	3	0	1
2. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	20	4	4
pos	12	5	12
n.a.	18	2	5
3. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	62	8	10
pos	60	13	28
n.a.	40	2	5
4. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	61	1	12
pos	30	1	11
n.a.	21	0	1

Die nachfolgende Abbildung 24 basiert auf den Daten der Tabelle 19. Für alle Immunisierungsperioden werden die prozentualen Anteile der OTC-Befunde sowohl in Bezug auf die serologisch negativen bzw. positiven Wildschweine angegeben.

Es wird ersichtlich, daß der weitaus größte Teil aller Wildschweine, nämlich insgesamt 66,6%, als negativ für OTC eingeordnet werden mußte. Unter den Ak-negativen Tieren nahm deren Anteil dabei von 38% nach der 1. o.I. auf 82% nach der 4. o.I. beständig zu. Unter den Ak-positiven Wildschweinen war der Anteil OTC-negativer ab der 2. Immunisierungsperiode immer etwas geringer als unter den Ak-negativen bzw. in gleichem Maße der Anteil OTC-positiver erhöht (zwischen 10 und 30 Prozentpunkten). Insgesamt waren aber nur 23,5% der Tiere OTC-positiv. Die Anteile OTC-fraglicher Wildschweine nahmen bis zur 4. Immunisierungsperiode hin ab und betragen insgesamt 9,9%. In allen vier

Immunisierungsperioden waren 73% der Ak-negativen Tiere OTC-negativ, 17,5% OTC-positiv und 9,5% OTC-fraglich. Von den Ak-positiven Wildschweinen waren 59,6% OTC-negativ, 30% OTC-positiv und 10,4% OTC-fraglich.

Abb. 24: Vergleich der OTC-Befunde zwischen den Ak-positiven und Ak-negativen Wildschweinen für den Landkreis Güstrow



Untersucht man die OTC-Nachweisrate in den einzelnen Altersklassen, kommt man zu den in Tabelle 20 aufgeführten Ergebnissen. Die Absolutzahlen sollen hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit genannt werden, sondern nur die prozentualen Anteile. Waren die Probenzahlen allerdings zu gering, wurde nur die Absolutzahl mit in die Tabelle aufgenommen. Das jeweils höchste Ergebnis ist grau unterlegt. In der 1. Immunisierungsperiode waren besonders unter den Frischlingen sowohl bei den Ak-negativen als auch -positiven Tieren die meisten von diesen OTC-positiv. Die Ak-positiven Überläufer und Alttiere waren vorwiegend OTC-negativ. Ab der 2. o.I. sind die Ergebnisse für die Ak-negativen Tiere aller Altersklassen tendenziell ähnlich, nämlich überwiegend OTC-negativ. Bei den Ak-positiven Wildschweinen sind nur die Frischlinge ausschließlich oder überwiegend OTC-negativ. Von den Ak-positiven Überläufern der 2. o.I. und den Alttieren der 3. o.I. ist der größere Teil OTC-positiv, was sich jedoch in der jeweils folgenden Immunisierungsperiode wieder ändert.

Tab. 20: OTC-Nachweise in den verschiedenen Altersklassen, getrennt nach Ergebnis der serologischen Untersuchung und Immunisierungsperioden (Landkreis Güstrow)

		OTC	1. o.I.	2. o.I.	3. o.I.	4. o.I.
Ak neg	Frischlinge	neg	41%	100%	76%	93%
		fragl	12%	0	11%	
		pos	47%	0	13%	7%
	Überläufer	neg	33%	36%	80%	79%
		fragl	50%	36%		2%
		pos	17%	28%	20%	19%
	Adulte	neg	20%		50%	1 Probe
		fragl	40%		50%	
		pos	40%	1 Probe		1 Probe
Ak pos	Frischlinge	neg	40%	100%	70%	100%
		fragl	10%		15%	
		pos	50%		15%	
	Überläufer	neg	86%	35%	76%	68%
		fragl		5%	12%	3%
		pos	14%	55%	12%	29%
	Adulte	neg	75%	37,5%	36%	75%
		fragl		50%	12%	
		pos	25%	12,5%	52%	25%

4.1.2.1.2. Landkreis Müritz

Die Tabelle 21 vergleicht die Antikörper- und OTC-Ergebnisse miteinander. Insgesamt wurden in der 1. Immunisierungsperiode 79 Wildschweine auf OTC untersucht, nach der 2. o.I. 67, nach der 3. o.I. 102 und in der 4. Immunisierungsperiode 108. Einige dieser Tiere konnten aufgrund fehlenden Blutes serologisch nicht bewertet werden. Nach der 1. bzw. 2. o.I. waren unabhängig von ihrem Antikörperstatus mehr Wildschweine OTC-positiv als – negativ, während es sich in den beiden letzten Immunisierungsperioden genau anders herum verhielt. Der OTC-Status einiger Wildschweine konnte auch nach Wiederholung der Untersuchung nicht geklärt werden.

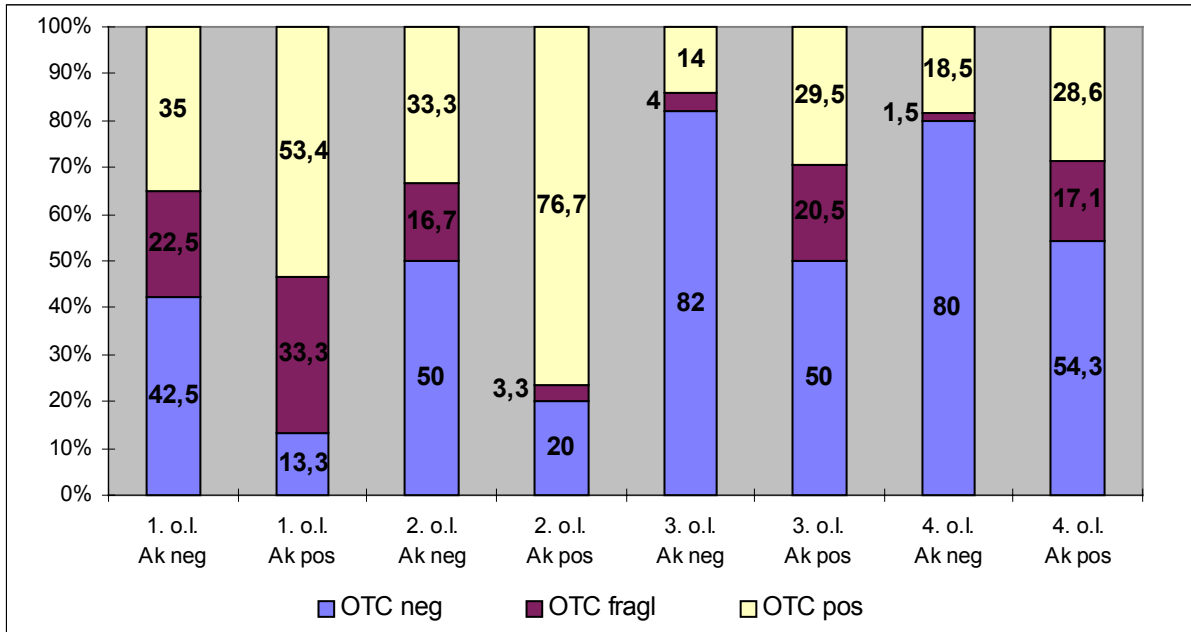
Tab. 21: Vergleich der Antikörper- mit den Oxytetracyclinergebnissen des Landkreises Müritz (n. a. = nicht auswertbar)

1. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	17	9	14
pos	2	5	8
n.a.	2	14	8
2. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	18	6	12
pos	6	1	23
n.a.	0	0	1
3. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	41	2	7
pos	22	9	13
n.a.	3	0	5
4. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	52	1	12
pos	19	6	10
n.a.	6	0	2

In der Abbildung 25 sind die prozentualen Anteile der drei möglichen OTC-Ergebnisse in den Kategorien der Ak-negativen bzw. -positiven Wildschweine im LK Müritz auf der Grundlage der Daten aus Tabelle 21 grafisch dargestellt. Es wird ersichtlich, daß mit 56,2% wieder die OTC-negativen Befunde überwogen. Der Anteil der OTC-negativen Wildschweine, welcher von der 1. bis zur 4. Immunisierungsperiode ständig zunahm, lag bei den Ak-positiven Tieren immer etwa 30 Prozentpunkte unter dem der Ak-negativen. Insgesamt waren 31,4% der Wildschweine OTC-positiv, wobei die meisten davon unter den Ak-positiven Tieren vor allem der 1. und 2. Immunisierungsperiode zu finden waren. Der Anteil der OTC-fraglichen Tiere betrug 12,4%, schwankte aber beträchtlich. Unter den serologisch positiven Wildschweinen war er insgesamt größer als unter den serologisch negativen.

Unter den Ak-negativen Wildschweinen ergab die OTC-Bewertung insgesamt 67% OTC-negative, 23,6% -positive und 9,4% -fragliche Tiere. Von den Ak-positiven Wildschweinen waren 39,5% OTC-negativ, 43,6% OTC-positiv und 16,9% OTC-fraglich.

Abb. 25: Vergleich der OTC-Befunde zwischen den Ak-positiven und Ak-negativen Wildschweinen für den Landkreis Müritz



In Tabelle 22 werden die prozentualen Anteile der OTC-Ergebnisse bei den einzelnen Altersklassen aufgeführt. Bei den meisten serologisch negativen Frischlingen und Überläufern konnte kein OTC nachgewiesen werden. Unter den adulten Wildschweinen waren in dieser Gruppe auch eine größere Anzahl OTC-positiver Tiere. Bei den serologisch positiven Tieren waren die Alttiere aller Immunisierungsperioden zum überwiegenden Teil OTC-positiv. Für die Frischlinge und Überläufer traf dies nur für die ersten beiden Immunisierungsperioden zu. Danach herrschten die OTC-negativen Ergebnisse vor.

Tab. 22: OTC-Nachweise in den verschiedenen Altersklassen, getrennt nach Ergebnis der serologischen Untersuchung und Immunisierungsperioden (Landkreis Müritz)

		OTC	1. o.I.	2. o.I.	3. o.I.	4. o.I.
Ak neg	Frischlinge	neg	50%	66,6%	96%	90,3%
		fragl	10%	16,7%	4%	3,2%
		pos	40%	16,7%	0	6,5%
	Überläufer	neg	33,3%	47,1%	61,5%	75%
		fragl	50%	17,6%	7,7%	0
		pos	16,7%	35,3%	30,8%	25%
	Adulte	neg	35,7%	28,6%	60%	0
		fragl	28,6%	14,3%	0	0
		pos	35,7%	57,1%	40%	2 Proben
Ak pos	Frischlinge	neg	9,1%	0	66,6%	0
		fragl	27,3%	0	16,7%	0
		pos	63,6%	0	16,7%	0
	Überläufer	neg	0	23,1%	33,3%	54,8%
		fragl	66,7%	3,8%	33,3%	19,4%
		pos	33,3%	73,1%	33,3%	25,8%
	Adulte	neg	1 Probe	0	20%	33,3%
		fragl	0	0	0	0
		pos	0	100%	80%	66,7%

4.1.2.1.3. Landkreis Ostvorpommern

Die Tabelle 23 zeigt einen Vergleich der Antikörper- mit den OTC-Ergebnissen. Zur Untersuchung kamen in der 1. Immunisierungsperiode insgesamt 138 Wildschweine, nach der 2. o.I. 424, nach der 3. o.I. 373 und nach der 4. o.I. 420. Wie schon in den beiden anderen Landkreisen, waren auch hier die meisten Wildschweine OTC-negativ. In der 1. Immunisierungsperiode gab es mehr Tiere mit einem fraglichen OTC-Status als positive.

Tab. 23: Vergleich der Antikörper- mit den Oxytetracyclinergebnissen des Landkreises Ostvorpommern (n. a. = nicht auswertbar)

1. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	41	24	22
pos	19	16	14
n.a.	1	1	0
2. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	158	29	58
pos	57	24	88
n.a.	5	0	5
3. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	165	45	64
pos	40	16	37
n.a.	4	0	1
4. o.I.	Oxytetracyclin		
	neg	fragl	pos
KSPV-Antikörper neg	244	21	53
pos	57	11	26
n.a.	5	1	2

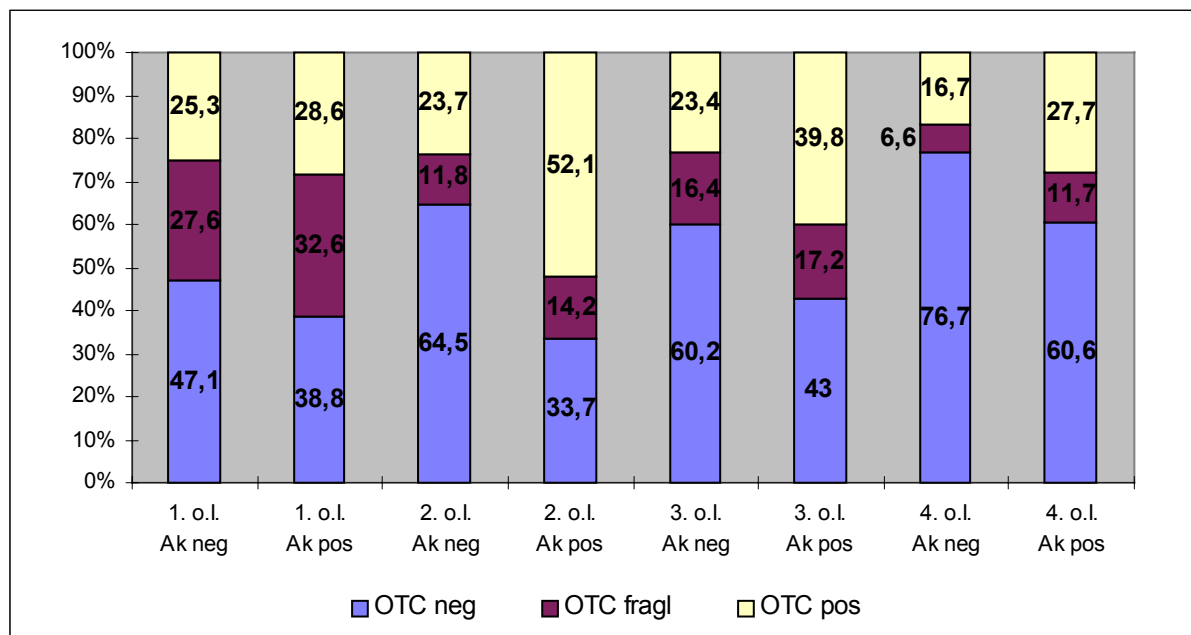
In der Abbildung 26 sind die OTC- und Antikörperbefunde für Ostvorpommern aus der Tabelle 23 in gleicher Weise wie für die anderen Landkreise in den vorhergegangenen Abbildungen dargestellt.

Wiederum überwogen mit insgesamt 58,8% die OTC-negativen Befunde. Es war eine Zunahme derselben von der 1. bis zur 4. Immunisierungsperiode hin zu beobachten. Bei den serologisch negativen Tieren lag der Anteil OTC-negativer Ergebnisse um 10 bis 30 Prozentpunkte über dem der serologisch positiven Tiere. In etwa gleichem Maße war der Anteil OTC-positiver Wildschweine, der insgesamt 27,2% betrug, unter den serologisch positiven gegenüber den serologisch negativen erhöht. Von insgesamt 14% der Wildschweine

konnte der OTC-Status trotz Nachuntersuchung nicht geklärt werden, wobei in der 1. Immunisierungsperiode diese Anteile am höchsten und in der 4. am niedrigsten waren.

Unter den Ak-negativen Wildschweinen befanden sich 65,8% OTC-negative, 21,3% OTC-positive und 12,9% OTC-fragliche, unter den Ak-positiven Tieren 42,7% OTC-negative, 40,7% -positive und 16,6% -fragliche.

Abb. 26: Vergleich der OTC-Befunde zwischen den Ak-positiven und Ak-negativen Wildschweinen für den Landkreis Ostvorpommern



Wie auch bei den vorherigen Landkreisen werden in Tabelle 24 für den LK Ostvorpommern Vergleiche zwischen Antikörper- und OTC-Nachweis bei den einzelnen Altersklassen ins Blickfeld gerückt. Von den Ak-negativen Tieren war die Mehrzahl ebenfalls OTC-negativ. Ebenso stellte sich die Situation bei den Ak-positiven Frischlingen aller sowie bei den Überläufern der 4. und Alttieren der 3. und 4. Immunisierungsperiode dar. Die serologisch positiven Überläufer der 2. und 3. sowie die Alttiere der 2. o.I. zeigten einen höheren Anteil der OTC-positiven gegenüber den OTC-negativen Befunden.

Tab. 24: OTC-Nachweise in den verschiedenen Altersklassen, getrennt nach Ergebnis der serologischen Untersuchung und Immunisierungsperioden (Landkreis Ostvorpommern)

		OTC	1. o.I.	2. o.I.	3. o.I.	4. o.I.
Ak neg	Frischlinge	neg	58,7%	85,7%	66,8%	93,5%
		fragl	15,2%	5,7%	12,4%	1,3%
		pos	26,1%	8,6%	20,8%	5,2%
	Überläufer	neg	33,3%	55,9%	43,9%	73,6%
		fragl	44,5%	14%	17,1%	5%
		pos	22,2%	30,1%	39%	21,4%
	Adulte	neg	30,8%	54,3%	29,6%	60%
		fragl	38,4%	14,3%	48,2%	25%
		pos	30,8	31,4%	22,2%	15%
Ak pos	Frischlinge	neg	48,3%	1 Probe	48,2%	0
		fragl	13,8%	0	11,1%	1 Probe
		pos	37,9%	1 Probe	40,7%	0
	Überläufer	neg	25%	34,7%	41,6%	55,6%
		fragl	62,5%	10,7%	4,2%	2,2%
		pos	12,5%	54,6%	54,2%	42,2%
	Adulte	neg	20%	29,7%	37,5%	66,7%
		fragl	60%	24,3%	30%	18,7%
		pos	20%	46%	32,5%	14,6%

4.1.2.2. Vergleich der Ergebnisse verschiedener Nachweismethoden des OTC

Einige ausgewählte, mikroskopisch unterschiedlich bewertete Knochenproben wurden im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Oldenburg mittels HPLC untersucht. Es wurden 8 in der mikroskopischen Auswertung positive, 7 negative, 2 fragliche sowie 3 fragliche, eine stärkere Tendenz zur positiven Bewertung aufweisende Proben für die Untersuchung mittels HPLC herangezogen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in Tabelle 25 wieder.

Von den 8 mikroskopisch OTC-positiv beurteilten Wildschweinen konnten 4 nach Untersuchung mittels HPLC ebenfalls als positiv bewertet werden, 3 wurden als OTC-negativ und eines als OTC-fraglich beurteilt. Bei einem der 4 positiven Tiere wurde kein OTC, sondern Tetracyclin detektiert.

Unter den 7 mikroskopisch OTC-negativ bewerteten Tieren befanden sich 6, die nach HPLC-Auswertung ebenfalls negativ sind; eines ist fraglich.

Beide OTC-fraglichen Tiere sind nach HPLC-Bewertung als negativ anzusehen.

Eines der drei OTC-fraglichen, dabei tendenziell positiven Tiere ist laut HPLC-Befund positiv für OTC, die beiden anderen negativ.

Eine fragliche Beurteilung in der HPLC kommt durch Matrixeffekte des Knochenmaterials zustande, die zu Überlagerungen führen. Dadurch ist die Identifizierung des OTC-Peaks nicht eindeutig möglich.

Tab. 25: Gegenüberstellung von Ergebnissen der OTC-Bewertung mittels Mikroskop und HPLC

Labornummer	Herkunft (Landkreis)	Mikroskopische Bewertung	Bewertung mittels HPLC
MV 1	Müritz	pos	pos
MV 2	Müritz	fragl	neg
MV 7	Müritz	pos	neg
MV 12	Ostvorpommern	neg	neg
MV 13	Ostvorpommern	neg	fragl
MV 17	Güstrow	neg	neg
MV 18	Güstrow	neg	neg
MV 737	Ostvorpommern	pos	pos
MV 739	Ostvorpommern	pos	neg
MV 827	Ostvorpommern	pos	pos
MV 878	Ostvorpommern	fragl	neg
MV 881	Ostvorpommern	neg	neg
MV 921	Ostvorpommern	neg	neg
MV 949	Ostvorpommern	pos	pos (kein OTC, sondern TC!)
MV 984	Müritz	fragl (pos?)	pos
MV 987	Güstrow	pos	fragl
MV 988	Güstrow	pos	neg
MV 1051	Ostvorpommern	fragl (pos?)	neg
MV 1054	Ostvorpommern	fragl (pos?)	neg
MV 1080	Müritz	neg	neg

4.1.3. Untersuchung auf KSPV-Antigen

4.1.3.1. Landkreis Güstrow

1. Immunisierungsperiode

In dieser Immunisierungsperiode wurden 55 Wildschweine des Landkreises auf KSPV-Antigen untersucht. Dabei wurde bei drei Wildschweinen KSPV nachgewiesen. Aus der Tabelle 26 wird ersichtlich, daß sich die Virusnachweise über den ganzen Zeitraum der 1. Immunisierungsperiode und auf alle Altersklassen sowie Geschlechter verteilten. Die drei Herkunftsorte liegen geografisch sehr nah beieinander. In der Tabelle 27 wird auf die labordiagnostischen Daten Bezug genommen. Die Untersuchungen auf Antikörper gegen das KSP-Virus sind als Screening-Ergebnis im CTB-ELISA und als quantitativer Befund der Titration des Serums auf der Zelllinie PKSU mit anschließendem indirektem Immunfluoreszenztest dargestellt. Die Befunde des Knochenmarks werden getrennt nach dem direkten und indirekten Immunfluoreszenztest aufgeführt. Der Virusnachweis in der Zellkultur erfolgte i.d.R. in der Zelllinie PK-15. Alle drei Wildschweine waren Ak-positiv mit z.T. sehr hohen Titern im IIFT und gleichzeitig OTC-negativ. Bei den beiden Tieren, von denen uns Knochenmarkproben zur Verfügung standen, konnte KSPV in selbigen nachgewiesen werden. Bei einem Frischling konnte aus dem Organmaterial KSPV nicht eindeutig in der Zellkultur nachgewiesen werden. Trotz intensivster Passagierung auf der Zelllinie PK-15 und 86 konnten nur wenige Male unklare Reaktionsmuster festgestellt werden. Bei den beiden in der Zellkultur KSPV-positiven Tieren wurde das Virus aus dem Organmaterial in Vierkantflaschen angezüchtet und die Virusernte anschließend für den Nachweis im IPMA verwendet.

Tab. 26: Angaben über Ag-positive Wildschweine (1. Immunisierung, Landkreis Güstrow)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsort	Alter / Körpermasse	Geschlecht
		t		
MV 17	16.01.95	Bützow	F / 10 kg	männlich
MV 71	02.02.95	Schlemmin	A / 50 kg	männlich
MV 258	08.03.95	Groß Upahl	Ü / 40 kg	weiblich

Tab. 27: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (1. Immunisierung, Landkreis Güstrow)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark		Zellkultur	PCR
				DIFT	IIFT		
MV 17	neg	pos	1:800	pos	pos	fragl	n.d.
MV 71	neg	pos	1:25600	pos	pos	pos nach Anz.	n.d.
MV 258	neg	pos	1:25600	fehlt	fehlt	pos nach Anz.	n.d.

Anz. = Anzüchtung, n.d. = nicht durchgeführt

2. Immunisierungsperiode

Nach der 2. o.I. wurden 88 Wildschweine auf KSPV-Antigen untersucht, davon war eines positiv. Dabei handelte es sich, wie aus Tabelle 28 hervorgeht, um einen Frischling, dessen Herkunftsort einen engen geografischen Bezug zu den Herkunftsorten der Wildschweine der 1. Immunisierungsperiode aus Tabelle 26 aufweist. Es war der erste KSPV-Nachweis nach mehreren Monaten Virusfreiheit. Dabei muß aber mit in Betracht gezogen werden, daß in den Monaten April bis Juli nur sehr wenige Wildschweine und ganz besonders wenige Frischlinge gestreckt wurde (vgl. Tabellen 7 und 8).

Tab. 28: Angaben über Ag-positive Wildschweine (2. Immunisierung, Landkreis Güstrow)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsort	Alter / Körpermasse	Geschlecht
MV 748	15.08.95	Oettelin	F / 10 kg	männlich

In Tabelle 29 sind die Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen zu finden. Der Virusnachweis wurde in der Zellkultur nach einer Anzüchtung aus dem Organmaterial geführt. In allen anderen untersuchten Parametern war der Frischling negativ.

Tab. 29: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (2. Immunisierung, Landkreis Güstrow)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark		Zellkultur	PCR
				DIFT	IIFT		
MV 748	neg	neg	neg	neg	neg	pos nach Anz.	n.d.

Anz. = Anzüchtung, n.d. = nicht durchgeführt

3. Immunisierungsperiode

259 Wildschweine wurden in den KSPV-Nachweis einbezogen, wovon 14 als positiv bewertet wurden. Wie die Angaben aus Tabelle 30 erkennen lassen, wurde das Virus schwerpunktmäßig in den Monaten November bis Januar vorrangig bei sowohl männlichen als auch weiblichen Frischlingen gefunden. Geografisch waren die Herkunftsorte über das ganze Immunisierungsgebiet des LK Güstrow verteilt und damit über eine wesentlich größere Region als in den beiden vorhergegangenen Immunisierungsperioden.

Tab. 30: Angaben über Ag-positive Wildschweine (3. Immunisierung, Landkreis Güstrow)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsort	Alter / Körpermasse	Geschlecht
MV 1079	06.11.95	Dreetz	F / 25 kg	
MV 1139	08.11.95	Groß Upahl	Ü / 40 kg	weiblich
MV 1274	01.12.95	Glave	F / 31 kg	männlich
MV 1389	20.11.95	Oettelin	F / 10 kg	männlich
MV 1391	20.11.95	Oettelin	F / 10 kg	männlich
MV 1425	15.12.95	Kirch Rosin	F / 38 kg	weiblich
MV 1433	16.12.95	Bornkrug	F / 23 kg	weiblich
MV 1442	13.12.95	Glasewitz	F / 40 kg	männlich
MV 1538	06.01.96	Bützow	F / 16 kg	
MV 1543	Januar 96		A	
MV 1726	30.01.96	Lohmen	F / 17 kg	weiblich
MV 1730	30.01.96	Groß Upahl	F / 30 kg	weiblich
MV 1745	01.02.96	Groß Upahl	A / 70 kg	männlich
MV 1750	02.02.96	Bornkrug	A / 72 kg	männlich

Tabelle 31 läßt erkennen, daß beim Antikörpernachweis zwischen dem ELISA und dem IIFT an einigen Stellen Differenzen auftraten. Zwei Frischlinge waren im CTB-ELISA negativ, während im IIFT Titer von 1:400 bzw. 1:50 gefunden wurden. Bei einem Alttier war das Ergebnis des CTB-ELISA positiv, während der IIFT negativ ausfiel. Zwei Alttiere und ein Frischling waren OTC-positiv bei ebenfalls positivem Antikörperbefund. Alle Wildschweine wurden in der Zellkultur, aber nur fünf im Knochenmark als viruspositiv erkannt. Die Mehrzahl der Virusnachweise gelang schon nach einer Virusanzüchtung bzw. direkt aus der

Organanreicherung heraus, u.a. auch bei den Tieren, die im Knochenmark positiv waren. Bei den übrigen Tieren wurde die Virusernte der Anzüchtung noch zweimal passagiert, bevor der Virusnachweis positiv ausfiel. Die Organanreicherungen von fünf Wildschweinen wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von Virusgenom untersucht, wobei drei Ergebnisse positiv ausfielen.

Tab. 31: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (3. Immunisierung, Landkreis Güstrow)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark		Zellkultur	PCR
				DIFT	IIFT		
MV 1079	neg	neg	1:400	neg	n.a.	pos nach Anz.	pos
MV 1139	neg	pos	1:800	neg	n.a.	pos nach Pass.	neg
MV 1274	neg	neg	1:50	pos	n.a.	pos nach Anz.	pos
MV 1389	neg	neg	n.d.	pos	n.a.	Organanr. pos	pos
MV 1391	neg	neg	n.d.	pos	n.a.	Organanr. pos	neg
MV 1425	neg	fehlt	n.d.	fehlt	fehlt	pos nach Pass.	n.d.
MV 1433	neg	pos	1:3200	fehlt	fehlt	pos nach Anz.	n.d.
MV 1442	neg	neg	neg	neg	neg	pos nach Anz.	n.d.
MV 1538	neg	fehlt	n.d.	neg	neg	pos nach Anz.	n.d.
MV 1543	pos	pos	n.d.	fehlt	fehlt	pos nach Pass.	n.d.
MV 1726	pos	pos	1:3200	pos	pos	pos nach Anz.	n.d.
MV 1730	fragl	pos	1:3200	pos?	pos	pos nach Anz.	n.d.
MV 1745	fragl	pos	1:800	neg	neg	pos nach Pass.	n.d.
MV 1750	pos	pos	neg	neg	neg	pos nach Pass.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt, n.a. = nicht auswertbar, Anz. = Anzüchtung, Organanr. = Organanreicherung, Pass. = Passagierung

4. Immunisierungsperiode

140 Wildschweine wurden auf KSPV-Antigen untersucht. Wie aus der Tabelle 32 hervorgeht, erwiesen sich davon fünf Tiere als Antigen(Ag)-positiv. Die meisten Virusnachweise erfolgten in den Monaten August und September, wobei die Virusfundorte über ein größeres

Gebiet verteilt lagen. Den Hauptanteil der viruspositiven Tiere machten Frischlinge beiderlei Geschlechts aus.

Tab. 32: Angaben über Ag-positive Wildschweine (4. Immunisierung, Landkreis Güstrow)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsor t	Alter / Körpermasse	Geschlecht
MV 2484	17.08.96	Kirch Rosin	Ü / 62 kg	männlich
MV 2529	27.08.96	Schlemmin	F / 16 kg	weiblich
MV 2547	02.09.96	Lähnwitz	F / 15 kg	männlich
MV 2642	21.09.96	Bansow	Ü	weiblich
MV 2710	08.10.96	Tieplitz	F / 18 kg	weiblich

Die Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen sind in Tabelle 33 aufgeführt. Bei den beiden Tieren, die auf KSPV-Antikörper untersucht werden konnten, traten Differenzen zwischen beiden Nachweismethoden auf. Der CTB-ELISA reagierte negativ, während die Ergebnisse im IIFT positiv ausfielen. OTC wurde bei keinem Wildschwein detektiert. Alle Organproben waren zu einem frühen Zeitpunkt in der Zellkultur positiv. Im Knochenmark zweier Tiere verlief der Ag-Nachweis positiv.

Tab. 33: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (4. Immunisierung, Landkreis Güstrow)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark		Zellkultur	PCR
				DIFT	IIFT		
MV 2484	neg	fehlt	n.d.	fehlt	fehlt	pos nach Anz.	n.d.
MV 2529	neg	neg	1:100	neg	neg	pos nach Anz.	n.d.
MV 2547	neg	neg	1:800	n.d.	pos	pos nach Anz.	n.d.
MV 2642	neg	fehlt	n.d.	n.d.	neg	pos nach Anz.	n.d.
MV 2710	neg	fehlt	n.d.	n.d.	pos	pos nach Anz.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt, Anz. = Anzüchtung

Zusammenfassung

Aus dem LK Güstrow wurden von den 23 KSPV-positiven Wildschweinen 22 in der Zellkultur als eindeutig positiv bewertet. Eine Probe (vgl. Tabelle 27) konnte lediglich als fraglich beurteilt werden.

Im Knochenmarkausstrich wurden 9 Proben als KSPV-positiv (vgl. Tabellen 27, 31 und 33) und ebenfalls 9 Proben als negativ (vgl. Tabellen 29, 31 und 33) bewertet. Bei fünf Tieren fehlte das Knochenmark. Bei 8 der 9 positiv beurteilten Knochenmarkausstriche erfolgte der KSPV-Nachweis in der Zellkultur entweder direkt aus der Organanreicherung heraus oder nach der ersten Anzüchtung. Eine in der Zellkultur unklare Probe war im Knochenmark eindeutig positiv (vgl. Tabelle 27). Von den im Knochenmark negativen Proben waren 6 nach der primären Anzüchtung in der Zellkultur positiv, bei drei Proben (vgl. Tabelle 31) gelang der KSPV-Nachweis erst nach Passagierung.

Lediglich fünf der 23 Proben wurden einer Beurteilung mittels PCR unterzogen, wovon drei Proben als positiv und zwei als negativ bewertet wurden (vgl. Tabelle 31).

Von den 18 Ag-positiven und gleichzeitig serologisch auswertbaren Wildschweinen besaßen 10 KSPV-Antikörper, die im CTB-ELISA detektiert wurden, was einer Antikörperprävalenz von 55,5% entspricht (vgl. Tabellen 27 und 31). Bei weiteren zwei Tieren lagen bei negativem Ergebnis im ELISA die Titer im IIFT über 1:200, was nach unserem Bewertungsmodus ebenfalls ein positives Ergebnis darstellen würde, wären die Tiere im ELISA fraglich (vgl. Tabellen 31 und 33). Von den 12 serologisch untersuchten Frischlingen waren vier (33,3%) Ak-positiv, während sowohl die beiden Überläufer als auch alle vier Alttiere KSPV-Antikörper besaßen.

Während alle 8 Ak-negativen Wildschweine schon nach der Primäranzüchtung in der Zellkultur als Ag-positiv diagnostiziert wurden und von diesen 50% im Knochenmark Ag-positiv waren (vgl. Tabellen 29, 31 und 33), wurde nur bei der Hälfte der Ak-positiven Tiere das Virus schon nach der Anzüchtung gefunden. Dagegen waren 62,5% der im Knochenmark auf KSPV untersuchten Ak-positiven Wildschweine darin positiv (vgl. Tabellen 27, 31 und 33).

Von den 10 virologisch und serologisch positiv beurteilten Wildschweinen aus dem LK Güstrow waren 5 OTC-negativ und drei OTC-positiv, wobei es sich bei den letzteren um zwei Alttiere und einen Frischling handelte (vgl. Tabellen 30 und 31). Zwei Tiere waren OTC-

fraglich. Alle 8 virologisch positiv und serologisch negativ beurteilten Wildschweine erwiesen sich auch als OTC-negativ.

4.1.3.2. Landkreis Müritz

1. Immunisierungsperiode

In diesem Zeitraum wurden aus dem LK Müritz 80 Wildschweine auf KSPV untersucht. Ein Alttier und ein Frischling waren im Februar bzw. März virologisch positiv. Die beiden Virusfundorte liegen geografisch nah beieinander.

Tab. 34: Angaben über Ag-positive Wildschweine (1. Immunisierung, Landkreis Müritz)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsort	Alter / Körpermasse	Geschlecht
		t		
MV 140	09.02.95	Müritzhof	A / 42 kg	weiblich
MV 261	11.03.95	Babke	F / 28 kg	weiblich

Wie aus Tabelle 35 hervorgeht, wurde aus den Organproben von beiden Tieren nach deren mehrfacher Passagierung KSPV isoliert. Der Virusnachweis im Knochenmark war bei dem Alttier negativ und bei dem Frischling nicht eindeutig, wobei leider die Möglichkeit der Wiederholung des Testes als IIFT nicht gegeben war. Bei jeweils positivem OTC-Ergebnis war das Alttier Ak-negativ, während der Frischling im IIFT auf PKSU Ak-positiv war.

Tab. 35: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (1. Immunisierung, Landkreis Müritz)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark		Zellkultur	PCR
				DIFT	IIFT		
MV 140	pos	neg	neg	neg	n.d.	pos nach Pass.	n.d.
MV 261	pos	fragl	1:200	fragl	n.d.	pos nach Pass.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt, Pass. = Passagierung

2. Immunisierungsperiode

In diesem Zeitraum wurden 67 Wildschweine aus dem LK Müritz auf KSPV untersucht. Ein Frischling wurde im Oktober als KSPV-positiv diagnostiziert (Tabelle 36).

Tab. 36: Angaben über Ag-positive Wildschweine (2. Immunisierung, Landkreis Müritz)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsort	Alter / Körpermasse	Geschlecht
MV 983	08.10.95	Waren	F / 8 kg	männlich

Die labordiagnostischen Daten sind in der Tabelle 37 zu finden. Der Virusnachweis erfolgte bei diesem Wildschwein aus der Organanreicherung nach Anzüchtung in der Zellkultur. Sowohl der Knochenmarknachweis als auch die PCR sowie auch die Antikörper- und OTC-Untersuchungen blieben negativ.

Tab. 37: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (2. Immunisierung, Landkreis Müritz)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark	Zellkultur	PCR	
				DIFT	IIFT		
MV 983	neg	neg	neg	neg	n.a.	pos nach Anz.	neg

n.a. = nicht auswertbar, Anz. = Anzüchtung

3. Immunisierungsperiode

104 Wildschweine wurden auf KSPV-Antigen untersucht, wovon 7 positiv waren. Wie die Tabelle 38 zeigt, wurden die meisten dieser Tiere im Januar bzw. Februar 1996, verteilt über das gesamte untersuchte Gebiet gestreckt. Bei der Mehrzahl handelte es sich um Frischlinge.

Tab. 38: Angaben über Ag-positive Wildschweine (3. Immunisierung, Landkreis Müritz)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsort	Alter / Körpermasse	Geschlecht
MV 1130	15.11.95	Waren	F / 16 kg	männlich
MV 1279	02.12.95	Waren	F / 25 kg	weiblich
MV 1518	Januar 96			
MV 1572	Januar 96			

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunft	Alter / Körpermasse	Geschlecht
MV 1596	12.01.96	Ankershagen	F / 37 kg	weiblich
MV 1781	12.02.96	Boek	F / 18 kg	weiblich
MV 1795	04.02.96	Babke	Ü / 54 kg	weiblich

Fortsetzung Tab. 38

Die labordiagnostischen Ergebnisse der Ag-positiven Wildschweine der 3. Immunisierungsperiode sind in Tabelle 39 zusammengefaßt. Bei 6 Tieren wurde das KSPV in der Zellkultur, zum überwiegenden Teil schon nach der Anzüchtung, isoliert. Das Virusisolat von einem dieser Tiere mit unbekanntem Alter verhielt sich bei der Passagierung in der Zelllinie PK-15 allerdings instabil und war nicht mehr nachweisbar, wobei der Virusnachweis im Knochenmark und in der PCR positiv ausfielen, während der Antikörpernachweis negativ war. Ein Frischling blieb in der Zellkultur auch nach wiederholten Versuchen der Virusanzüchtung negativ, war im Knochenmarkausstrich aber eindeutig positiv bei ebenfalls positivem Ergebnis im CTB-ELISA. Neben diesen beiden Wildschweinen war noch ein weiteres im Knochenmark Ag-positiv. Bei fünf der 7 Proben konnte KSPV-Genom mit der PCR nachgewiesen werden.

Tab. 39: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (3. Immunisierung, Landkreis Müritz)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark		Zellkultur	PCR
				DIFT	IIFT		
MV 1130	neg	neg	neg	pos	n.a.	pos nach Anz.	pos
MV 1279	neg	pos	1:6400	neg	neg	pos nach Anz.	pos
MV 1518	neg	neg	neg	fragl	pos	pos nach Anz., nach Pass. neg!	pos
MV 1572	pos	neg	neg	neg	neg	pos nach Pass.	neg
MV 1596	fragl	pos	neg	fragl	pos	neg	neg
MV 1781	neg	neg	neg	neg	fragl	pos nach Anz.	pos
MV 1795	neg	pos	neg	neg	neg	pos nach Pass.	pos

n.a. = nicht auswertbar, Anz. = Anzüchtung, Pass. = Passagierung

4. Immunisierungsperiode

Alle 111 auf KSPV-Virus untersuchten Wildschweinproben aus dem LK Müritz waren in diesem Zeitraum negativ.

Zusammenfassung

Bei 9 der insgesamt 10 KSPV-positiven Wildschweine aus dem LK Müritz wurde der Virusnachweis in der Zellkultur geführt. Ein Tier erwies sich trotz mehrfacher Passagierung in der Zellkultur als negativ, wobei dieses Tier sowohl im Knochenmark als auch in der PCR ein eindeutig positives Ergebnis zeigte (vgl. Tabelle 39). Von den anderen 9 Wildschweinen waren zwei im Knochenmark positiv (vgl. Tabelle 39). Bei diesen beiden konnte der Virusnachweis nach der Anzuchtung in der Zellkultur geführt werden, wobei eine dieser Proben durch Passagierung negativ wurde. Zwei weitere Tiere waren im Knochenmark fraglich (vgl. Tabellen 35 und 39) und die restlichen fünf negativ. Bei einem im Knochenmark fraglichen Wildschwein gelang der KSPV-Nachweis nach Anzuchtung, bei einem weiteren erst nach Passagierung. Drei der im Knochenmark negativen Proben konnten erst nach Passagierung als KSPV-positiv erkannt werden, bei den anderen zwei reichte die Anzuchtung aus, um zu diesem Resultat zu gelangen (vgl. Tabellen 35 und 39).

Eine PCR wurde bei 8 Tieren durchgeführt. Von insgesamt fünf in der PCR positiven Tieren waren vier nach der Anzuchtung in der Zellkultur positiv und eines erst nach Passage (vgl. Tabelle 39). Von den drei in der PCR negativen Tieren war eines in der Zellkultur ebenfalls nach Anzuchtung positiv und eines nach Passage (vgl. Tabellen 37 und 39). Bei einem PCR-negativem Wildschwein gelang die Virusisolierung in der Zellkultur nicht, sondern nur der Ag-Nachweis im Knochenmark (vgl. Tabelle 39).

Von den 10 KSPV-positiven Wildschweinen reagierten drei im CTB-ELISA positiv und eines fraglich. Das fragliche Tier wurde im IIFT als positiv erkannt, womit insgesamt vier Wildschweine, d.h. 40%, Ak-positiv waren (vgl. Tabellen 35 und 39). Von den 6 Frischlingen war die Hälfte Ak-positiv, weiterhin ein Überläufer (Tabellen 34 bis 39).

Von den 6 Ak-negativen Wildschweinen waren vier schon nach der Anzuchtung in der Zellkultur Ag-positiv, wobei zwei Tiere im Knochenmark positiv und eins fraglich reagierten (vgl. Tabellen 37 und 39). Die beiden erst nach Passagierung positiven Wildschweine zeigten im Knochenmark keine KSPV-spezifische Reaktion (vgl. Tabellen 35 und 39).

Nur bei einem der vier Ak-positiven Wildschweine gelang der Virusnachweis in der Zellkultur bereits nach der Anzüchtung (bei negativem Knochenmark; vgl. Tabelle 39) und bei zwei Wildschweinen nach Passage (bei negativem bzw. fraglichem Knochenmark; vgl. Tabellen 35 und 39). Bei einem Tier konnte kein Virus isoliert werden. Bei diesem Wildschwein wurde nur das Knochenmark als KSPV-positiv bewertet (Tabelle 39).

Zwei der vier virologisch und serologisch positiven Tiere waren im OTC-Nachweis negativ, eins fraglich (vgl. Tabelle 39) und eins positiv (vgl. Tabelle 35). Von den 6 virologisch positiven und serologisch negativen Proben waren vier auch OTC-negativ (vgl. Tabellen 37 und 39). Zwei Wildschweine wurden als OTC-positiv bewertet (vgl. Tabellen 35 und 39).

4.1.3.3. Landkreis Ostvorpommern

1. Immunisierungsperiode

Von insgesamt 144 auf das KSPV untersuchten Wildschweinen waren 11 positiv. Wie der Tabelle 40 zu entnehmen ist, wurden die meisten virologisch positiven Tiere im Februar gestreckt. Die Erlegungsorte verteilten sich über fast das gesamte Untersuchungsgebiet. Es handelte es sich zu 46% um Frischlinge, zu 36% um Überläufer und zu 18% um Alttiere und dabei größtenteils um weibliche Tiere.

Tab. 40: Angaben über Ag-positive Wildschweine (1. Immunisierung, Landkreis Ostvorpommern)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsort	Alter / Körpermasse	Geschlecht
MV 89	10.02.95	Klein Bünzow	Ü / 48 kg	weiblich
MV 92	10.02.95	Quilow	A	männlich
MV 95	10.02.95	Hohensee	Ü / 45 kg	weiblich
MV 106	10.02.95	Wusterhusen	A / 78 kg	weiblich
MV 129	10.02.95	Drewelow	F	weiblich
MV 192	20.02.95	Bugewitz	Ü / 38 kg	weiblich
MV 220	Februar 95		F / 20 kg	männlich
MV 226	01.03.95	Kröslin	F / 15 kg	weiblich
MV 235	08.03.95	Lubmin	F / 19 kg	weiblich
MV 246	12.03.95	Boltenhagen	Ü / 30 kg	weiblich
MV 287	21.03.95	Rebelow	F / 27 kg	weiblich

Die labordiagnostischen Daten der Ag-positiven Wildschweine sind in der Tabelle 41 aufgeführt. Bei fünf Tieren gelang ein Virusnachweis bereits nach der Anzüchtung. Dabei vermehrte sich ein Isolat nur in der Zelllinie 86 und ein weiteres zeigte ein instabiles Replikationsverhalten in den verwendeten Zelllinien, aber diese beiden Proben waren die einzigen mit positivem Knochenmarknachweis und ebenfalls in der PCR positiv. Die übrigen 6 Wildschweine waren erst nach Passagierung positiv und im Knochenmark negativ. Aus zeitlichen Gründen konnten leider der IIFT auf PKSU sowie der Virusnachweis im Knochenmark mittels IIFT bei fast keinem Tier durchgeführt werden.

Tab. 41: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (1. Immunisierung, Landkreis Ostvorpommern)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark		Zellkultur	PCR
				DIFT	IIFT		
MV 89	neg	neg	n.d.	neg	n.d.	pos nach Pass.	n.d.
MV 92	pos	pos	n.d.	neg	n.d.	pos nach Pass.	n.d.
MV 95	fragl	neg	n.d.	neg	n.d.	pos nach Pass.	n.d.
MV 106	fragl	pos	n.d.	neg	n.d.	pos nach Anz.	n.d.
MV 129	pos	pos	n.d.	neg	n.d.	pos nach Pass.	n.d.
MV 192	fragl	neg	neg	neg	n.d.	pos nach Pass.	n.d.
MV 220	fehlt	fehlt	n.d.	neg	n.d.	pos nach Anz.	n.d.
MV 226	neg	pos	n.d.	pos	n.d.	pos nach Anz. (nur auf 86!)	pos
MV 235	neg	neg	n.d.	neg	n.d.	pos nach Anz.	n.d.
MV 246	neg	neg	n.d.	fragl	pos	pos nach Anz., aber instabil	pos
MV 287	neg	neg	n.d.	neg	n.d.	pos nach Pass.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt, Pass. = Passagierung, Anz. = Anzüchtung

2. Immunisierungsperiode

Bei keinem der 428 untersuchten Wildschweine konnte KSPV nachgewiesen werden.

3. Immunisierungsperiode

Von 414 Wildschweinen waren 8 KSPV-positiv. Wie aus der Tabelle 42 ersichtlich ist, verteilten sich die Virusfunde wie schon in der 1. Immunisierungsperiode über ein größeres Gebiet. Viruspositive Tiere wurden vor allem im Januar und Februar gefunden. 75% dieser Wildschweine waren Frischlinge, der Rest Überläufer, wobei die beiden Geschlechter annähernd gleich stark vertreten waren.

Tab. 42: Angaben über Ag-positive Wildschweine (3. Immunisierung, Landkreis Ostvorpommern)

Labor-Nr.	Erlegungsdatum	Herkunftsort	Alter / Körpermasse	Geschlecht
MV 1151	21.11.95	Hanshagen	F / 30 kg	weiblich
MV 1158	21.11.95	Wusseken	F / 24 kg	weiblich
MV 1399	15.12.95	Jägerhof	F / 35 kg	weiblich
MV 1459	04.01.96	Buddenhagen	Ü / 57 kg	männlich
MV 1660	21.01.96	Rossin	F / 22 kg	männlich
MV 1758A	04.02.96	Wrangelsburg	F / 30 kg	männlich
MV 1800	10.02.96	Thurow	Ü / 53 kg	weiblich
MV 1805	23.02.96	Karlsburg	F / 35 kg	weiblich

Die Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen sind in der Tabelle 43 zu finden. Demnach war nur eins der 8 Wildschweine schon nach der Anzucht in der Zellkultur positiv (ebenfalls positiv in der PCR) und fünf nach Passagierung der Organanreibungen in der Zellkultur (davon zwei in der PCR negativ). Bei je einem Frischling und Überläufer konnte kein KSPV in der Zellkultur isoliert werden, wohl aber wurde ein eindeutig positiver Nachweis im Knochenmark geführt. Eines dieser beiden Tiere war auch in der PCR positiv. Bei keinem der 7 serologisch auswertbaren Wildschweine wurden KSPV-Antikörper detektiert, wobei allerdings drei Frischlingsproben OTC-positiv waren.

Tab. 43: Ergebnisse aller Untersuchungen der Ag-positiven Wildschweine (3. Immunisierung, Landkreis Ostvorpommern)

Labor-Nr.	OTC	KSPV-Antikörper		KSPV-Antigen / -Genom			
		ELISA	IIFT	Knochenmark		Zellkultur	PCR
				DIFT	IIFT		
MV 1151	neg	neg	n.d.	neg	n.d.	pos nach Pass.	neg
MV 1158	pos	neg	n.d.	neg	n.d.	pos nach Pass.	neg
MV 1399	pos	neg	n.d.	neg	neg	pos nach Anz.	pos
MV 1459	neg	neg	n.d.	neg	neg	pos nach Pass.	n.d.
MV 1660	neg	neg	n.d.	neg	neg	pos nach Pass.	n.d.
MV 1758A	neg	fehlt	n.d.	neg	pos	neg	pos
MV 1800	neg	neg	n.d.	fragl	pos	neg	neg
MV 1805	pos	neg	n.d.	neg	neg	pos nach Pass.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt, Pass. = Passagierung, Anz. = Anzüchtung

4. Immunisierungsperiode

Von 436 untersuchten Wildschweinen war keines positiv für KSPV.

Zusammenfassung

Im LK Ostvorpommern waren 17 der 19 insgesamt als KSPV-positiv diagnostizierten Wildschweine in der Zellkultur positiv. Die beiden in der Zellkultur negativen Tiere wurden aufgrund der Beurteilung des Knochenmarkausstriches positiv. Bei einer der beiden in der Zellkultur und im Knochenmark positiven Proben gelang die Virusisolierung nach der Anzüchtung, aber nur in der Linie 86. Die andere Probe konnte ebenfalls nach der Anzüchtung der Organanreicherung als KSPV-positiv identifiziert werden, zeigte aber im weiteren Verlauf der Passagierung ein instabiles Vermehrungsverhalten in der Zellkultur (vgl. Tabelle 41). Von den im Knochenmark negativen Proben (15) zeigten sich vier nach der Anzüchtung, 11 erst nach Passagierung positiv (vgl. Tabellen 41 und 43).

Insgesamt 7 Wildschweine wurden zusätzlich mittels PCR untersucht, wobei davon vier positiv waren, darunter die beiden oben erwähnten Knochenmark-positiven Tiere (vgl. Tabellen 41 und 43). Insgesamt erwiesen sich drei dieser Wildschweine schon nach Anzüchtung der Organanreicherungen in der Zellkultur als positiv. Das vierte Tier war in der

Zellkultur negativ. Von den drei übrigen, in der PCR negativen Wildschweinen zeigten zwei in der Zellkultur ein positives Ergebnis nach Passage. Ein Tier war auch in der Zellkultur negativ (vgl. Tabelle 43).

Von den 17 serologisch auswertbaren Wildschweinen waren vier Ak-positiv (23,5%). Dabei handelte es sich um zwei Frischlinge und zwei Alttiere (vgl. Tabellen 40 und 41). Damit waren zwei von 9 (22%) Frischlingen und beide Alttiere, aber keiner der 6 Überläufer Ak-positiv.

Von den 13 Ak-negativen Wildschweinen waren drei bereits nach der Anzucht und 9 erst nach Passagierung in der Zellkultur positiv. Alle diese Tiere waren im Virusnachweis im Knochenmark negativ (vgl. Tabellen 41 und 43). Bei einem Ak-positiven Wildschwein, welches im Knochenmark eindeutig Ag-positiv war, konnte das Virus nicht in der Zellkultur isoliert und auch kein Virusgenom mittels PCR nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 43).

Von den vier Ak-positiven Wildschweinen wurden zwei schon nach der Anzucht, die anderen beiden erst nach Passagierung der Organanreicherung als viruspositiv diagnostiziert (vgl. Tabelle 43). Eines der Tiere war dabei neben dem Nachweis aus der Primäranzucht auch im Knochenmark und in der PCR positiv, eine Virusvermehrung war aber nur in der Zelllinie 86 möglich.

Von den vier virologisch und serologisch positiven Wildschweinen waren zwei OTC-positiv, eins OTC-fraglich und eins OTC-negativ. Von den 13 virologisch positiven und serologisch negativen Proben waren drei OTC-positiv, zwei im OTC-Nachweis fraglich sowie 8 negativ.

4.1.4. Vergleich der KSPV-Virusinzidenzen mit den Antikörperprävalenzen

Insgesamt wurden aus den Immunisierungsgebieten der drei Landkreise Güstrow, Müritz und Ostvorpommern in allen vier Immunisierungsperioden 2326 Wildschweine auf das Vorhandensein von KSPV-Antigen untersucht, von denen 52 als Ag-positiv diagnostiziert wurden. Das entspricht einem Anteil Ag-positiver Tiere von 2,2%.

Die Tabelle 44 gibt einen Überblick über die Virusinzidenzen für alle virologisch untersuchten Wildschweine sowie für die einzelnen Altersklassen. Im LK Güstrow wurde die höchste Virusinzidenz festgestellt (23 von 542 Wildschweinen KSPV-positiv), gefolgt vom LK Müritz (10 von 362 Wildschweinen) und von Ostvorpommern mit 19 Ag-positiven von insgesamt 1422 untersuchten Tieren. Bei einem Vergleich der drei Altersklassen wird deutlich, daß jeweils unter den Frischlingen die Virusinzidenz am höchsten war und oberhalb

des Wertes für alle untersuchten Wildschweine lag. Auffallend hoch ist außerdem der Anteil virologisch positiver Alttiere im LK Güstrow.

Tab. 44: Virusinzidenzen in den einzelnen Altersklassen für die ersten vier Immunisierungsperioden

	LK Güstrow	LK Müritz	LK Ostvorpommern
alle untersuchten Wildschweine	4,2%	2,8%	1,3%
Frischlinge	6%	4%	2,2%
Überläufer	2,1%	0,6%	0,95%
Adulte	5%	2,1%	0,75%

Unter den virologisch positiven Wildschweinen waren die einzelnen Altersklassen wie folgt vertreten:

Von den insgesamt 23 virologisch positiven Wildschweinen des Landkreises Güstrow gehörten 15 zur Altersklasse der Frischlinge, vier zu den Überläufern und ebenfalls vier zu den Alttieren (vgl. Tabellen 26, 28, 30 und 32).

Unter den insgesamt 10 KSPV-positiven Wildschweinen des Landkreises Müritz befanden sich 6 Frischlinge, ein Überläufer und ein Alttier. Von zwei Tieren fehlten die erforderlichen Angaben (vgl. Tabellen 34, 36 und 38).

Im LK Ostvorpommern handelte es sich bei 11 von 19 KSPV-positiven Tieren um Frischlinge, bei 6 Tieren um Überläufer und bei den übrigen beiden um Alttiere (vgl. Tabellen 40 und 42).

Die Frischlingspopulation stellte somit in allen drei Landkreisen den Hauptanteil der Virusträger. Im LK Güstrow waren das 66%, im LK Müritz 75% und im LK Ostvorpommern 58% und damit über alle gemittelt 64%. Die Überläuferanteile betragen 17% im LK Güstrow, 12,5% im LK Müritz und 32% im LK Ostvorpommern, das waren über alle gemittelt 22%. Die Alttiere machten einen Anteil von 17% im LK Güstrow, 12,5% im LK Müritz und 10% im LK Ostvorpommern aus, über alle gemittelt 14%. Es sei hier auf einen Zusammenhang mit den Abbildungen 6, 10 und 14 verwiesen, woraus hervorgeht, daß der Anteil der Frischlinge an den insgesamt gestreckten Wildschweinen in jedem einzelnen Landkreis deutlich niedriger lag als der Anteil der Frischlinge an den virologisch positiven Tieren.

In der Tabelle 45 sind die Virusinzidenzen in den einzelnen Landkreisen und Immunisierungsperioden ohne Altersklassenbezug dargestellt. Es wird ersichtlich, daß zwischen den einzelnen Zeiträumen Schwankungen in der Virusinzidenz auftraten, wobei die meisten positiven KSPV-Nachweise in den Wintermonaten, also in der 1. und 3. Immunisierung zu verzeichnen waren. Dazu ist anzumerken, daß der Anteil gestreckter Frischlinge, welche den Hauptanteil der diagnostizierten Virusträger ausmachten, in der 2. bzw. 4. Immunisierungsperiode sehr gering war (vgl. Tabellen 8, 10, 12, 14, 16 und 18).

Tab. 45: Virusinzidenzen in den einzelnen Immunisierungsperioden

	LK Güstrow	LK Müritz	LK Ostvorpommern
1. o.I.	5,5%	2,5%	7,6%
2. o.I.	1,1%	1,5%	0
3. o.I.	5,4%	6,7%	1,9%
4. o.I.	3,6%	0	0

Zusammenfassung

In den Monaten vor Beginn der o.I. (Januar bis Dezember 1994) bewegten sich die serologisch positiven Befunde im „Wildschweinpest“-gefährdeten Bezirk zwischen 16,5% (Februar) und 40,1% (Dezember). Dabei wurden in den ersten vier Monaten des Jahres 1994 jeweils ca. 20%, im Mai ca. 30%, im Juni und Juli jeweils ca. 35% und in den darauffolgenden vier Monaten zwischen 25 und 30% serologisch positive Tiere diagnostiziert (Kiupel et al., 1995). Zu diesem „Wildschweinpest“-gefährdeten Bezirk gehörte auch das von uns untersuchte Teilgebiet des LK Güstrow.

Mit einer Antikörperprävalenz von 43,1% nach der 1. o.I. in den ersten drei Monaten des Jahres 1995 war somit ein Anstieg gegenüber den gleichen Monaten des Vorjahres zu verzeichnen, wohingegen der Anstieg gegenüber Dezember 1994 nur gering ausfiel. Mit 5,4% virologisch positiven Wildschweinen (drei Tiere) lag der LK Güstrow unter dem von Kiupel et al. (1995) für den gleichen Zeitraum angegebenen Vorjahresniveau von ca. 8%, aber über dem Durchschnitt von 1,7% für die entsprechenden Monate des Jahres 1995 für alle „Wildschweinpest“-gefährdeten Bezirke. Alle Ag-positiven Tiere besaßen auch Ak gegen KSPV, was auf einen subakuten Krankheitsverlauf hindeutet.

In der Folgezeit stieg die Antikörperrate nach der 2. o.I. bis einschließlich Oktober auf ca. 51% an, wobei in den Monaten April bis Juni kaum Wildschweine gestreckt wurden. In

diesem Zeitraum sank der Nachweis von Ag-positiven Tieren auf 1,1% (ein Tier). Dabei handelte es sich um einen Ak-negativen Frischling.

Die nachfolgende 3. Immunisierungsperiode von November 1995 bis einschließlich März 1996 brachte wiederum einen Anstieg des Anteils Ak-positiver Tiere auf ca. 56%, aber auch des Anteils Ag-positiver Tiere auf 5,4% (14, davon 10 Frischlinge). Von den Ag-positiven Tieren besaßen 42% KSPV-Ak, 58% waren serologisch negativ.

Nach der 4. o.I. von April bis Oktober 1996 fielen die Anteile Ak-positiver Wildschweine auf ca. 35% ab. Die Virusbefunde lagen mit 3,6% (fünf Tiere, davon drei Frischlinge und zwei Überläufer) höher als im Vorjahr. Der Antikörperstatus aller virologisch positiven Tiere war negativ, was für ein nach wie vor akutes Infektionsgeschehen bzw. auch mögliche persistente Infektionen der Frischlinge spricht.

Der LK Müritz gehörte vor Beginn der o.I. zum „Wildschweinpest“-freien Gebiet.

Nach der 1. o.I. im Dezember 1994 betrug der Anteil serologisch positiver Tiere 28,6%. Im Februar bzw. März 1995 ließ sich bei zwei Tieren (2,5%), einem Frischling und einer Bache, KSPV-Antigen nachweisen. Beide Isolate waren erst nach mehreren Passagen in der Zellkultur detektierbar. Der Frischling war im CTB-ELISA serologisch fraglich, im IIFT wurde ein geringer Antikörpertiter von 1:200 festgestellt. Die Bache mit der Labornummer MV 140 war Ak-negativ (vgl. dazu auch Tabellen 31 und 32). Das Isolat MV 140 von diesem Alttier wurde von uns im Tierversuch eingesetzt und erwies sich als schwachvirulent (siehe dazu die Punkte 3.9.4. und 4.4.).

Nach der 2. o.I. vom März und April 1995 waren 44,4% der untersuchten Tiere Antikörperträger. Es wurde ein Frischling als Virusträger ermittelt (1,5%), wobei dieser serologisch negativ war.

Nach der 3. o.I. wurde mit 45,8% serologisch positiven Tieren nur ein geringer Anstieg erreicht, dagegen stieg der Anteil virologisch positiver Tiere auf 6,7% (7 Tiere). Unter diesen Tieren befanden sich vier Frischlinge und ein Überläufer. Von den beiden übrigen KSPV-positiven Wildschweinen sind Angaben zum Alter nicht bekannt. Bei den Ag-positiven Tieren war der Antikörperstatus überwiegend negativ (vier Tiere oder 57%).

Auch im LK Müritz fiel der Anteil der Antikörperträger nach der 4. o.I. auf 35% ab. KSPV wurde in dieser Immunisierungsperiode nicht nachgewiesen.

Im LK Ostvorpommern waren in den Monaten Januar bis April 1994 zwischen 2 und 10% der Schwarzwildpopulation Antikörperträger. Dieser Anteil stieg in den Monaten Mai bis

November 1994, also unmittelbar vor Beginn der o.I., auf Werte zwischen 13 und 20% (im Durchschnitt etwa 16%). Bis zum Beginn der o.I. wurde kein KSPV nachgewiesen (Kaden, persönliche Mitteilung).

Nach der 1. o.I. wurden 35,5 % der Wildschweine als Ak-positiv ermittelt. Gleichzeitig waren 11 Tiere, das sind 7,6% der insgesamt untersuchten, Ag-positiv. Von diesen Virusträgern waren 40% Ak-positiv. Der Frischling mit der Labornummer MV 220 wurde mit zentralnervösen Symptomen gestreckt, die übrigen Wildschweine waren laut Probenbegleitschein klinisch unauffällig. Von den 11 Virusisolaten ließen sich 6 nur nach mehrfacher Passagierung in der Zellkultur nachweisen. Eines der anderen Isolate war nicht in der üblichen Zelllinie PK-15, sondern nur in der Linie 86 anzuzüchten. Ein weiteres verhielt sich bei den Passagen instabil und war nicht nach jeder Passage nachweisbar.

Nach der 2. o.I. stieg der Anteil Ak-positiver Wildschweine auf 40,4%. Virusbefunde gab es in diesem Zeitraum keine.

Nach der 3. o.I. sank die Antikörperprävalenz auf 26,7%. Bei 1,9% der untersuchten Tiere war KSPV nachweisbar. Zwei dieser insgesamt 8 virologisch positiven Proben wurden nur durch den IIFT im Knochenmark als Ag-positiv diagnostiziert. Eine Virusanzüchtung gelang nicht. Eine dieser beiden Proben war in der RT-PCR positiv. Bei keinem der Tiere mit positivem Virusbefund wurden KSPV-spezifische Ak gefunden.

Die 4. o.I. vom März und April 1996 erbrachte in ihrem Ergebnis nur 22,9% Ak-positiver Tiere. KSPV war in diesem Zeitraum nicht nachweisbar.

4.2. Untersuchung zur Antikörperentwicklung nach o.I. gegen KSPV bei anschließender Challengeinfektion

4.2.1. Auftreten KSPV-spezifischer Antikörper

Das Serum der wie unter Punkt 3.9.2. beschrieben immunisierten Hausschweine wurde im Verlauf von 5 Wochen in den in Tabelle 46 angegebenen Abständen auf KSPV-spezifische Antikörper untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten mit dem CTB-ELISA-System und ab dem 4. d p.v. auch mittels IIFT auf PKSU. Es zeigten sich nur geringe Unterschiede im zeitlichen Auftreten der Antikörper zwischen den einzelnen Tieren. Erste positive Befunde konnten am 9. d p.v. mittels IIFT erstellt werden, wohingegen am selben Tag erst ein Tier im ELISA eine fragliche Reaktion zeigte. Am 35. d p.v., dem Tag der Challengeinfektion, zeigten alle Tiere im CTB-ELISA eine positive Reaktion und besaßen im IIFT einen Antikörpertiter von mindestens 1:400.

Tab. 46: Ergebnisse der Untersuchungen auf spezifische Antikörper gegen KSPV nach experimenteller oraler Immunisierung

Tage p.v.	Tier 1		Tier 2		Tier 3		Tier 4		Tier 5	
	ELISA	IIFT	ELISA	IIFT	ELISA	IIFT	ELISA	IIFT	ELISA	IIFT
0	neg	n.d.	neg	n.d.	neg	n.d.	neg	n.d.	neg	n.d.
2	neg	n.d.	neg	n.d.	neg	n.d.	neg	n.d.	neg	n.d.
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9	neg	1:50	neg	neg	neg	1:50	neg	neg	fragl	1:50
11	neg	1:100	neg	1:25	fragl	1:100	fragl	neg	fragl	1:100
18	fragl	1:200	fragl	1:200	pos	1:400	pos	1:400	pos	1:800
35	pos	1:400	pos	1:800	pos	1:400	pos	1:400	pos	1:800

n.d. = nicht durchgeführt

4.2.2. Schutzwirkung

Nach der Infektion mit hochvirulentem KSPV wurden bei keinem der vakzinierten Tiere klinische Symptome beobachtet. Ein Anstieg der Körpertemperaturen konnte ebenfalls nicht registriert werden. Bei allen Schweinen wurde in der Infektionsphase eine

Körpermassenzunahme um ca. 8 bis 13,5 kg ermittelt, deren genaue Werte in Tabelle 47 dargestellt sind.

Tab. 47: Körpermasse zu Beginn und am Ende der Infektionsphase nach experimenteller oraler Immunisierung

	Körpermasse (kg)				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
35. d p.v.	36,2	29	36	34,9	33,4
18. d p.i.	49,0	37,2	44,2	48,4	42

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung am 18. d p.i. waren die Tiere 2 und 5 ohne besonderen Befund. Die Tiere 1, 3 und 4 zeigten geringgradige pathologisch-anatomische Veränderungen an einzelnen Organen, insbesondere an den Lungen in Form einer katarrhalischen Pneumonie. Keine dieser Veränderungen wies jedoch auf KSP hin.

4.2.3. Nachweis von Impf- bzw. Challengevirus

Die Untersuchungen zum Nachweis von KSPV-Impf- bzw. -Challengevirus erfolgten zeitgleich mit der Antikörperuntersuchung. Bei den Tieren 1, 2, 4 und 5 konnte bis einschließlich zum 35. d p.v. kein Impfvirus aus Vollblut, Buffy coat oder Nasentupfer reisoliert werden.

Beim Tier 3 wurde am 7. d p.v. KSPV im Blut nachgewiesen. Das isolierte Virus verhielt sich bei Passagierungsversuchen in der Zelllinie 86 sehr instabil. Eine Identifizierung mittels monoklonaler Antikörper gelang nicht, da hierfür der Virustiter nicht ausreichend hoch war. Es kann sich hierbei allerdings nur um das Impfvirus gehandelt haben, da der Kontakt mit einem anderen KSPV-Stamm auszuschließen ist.

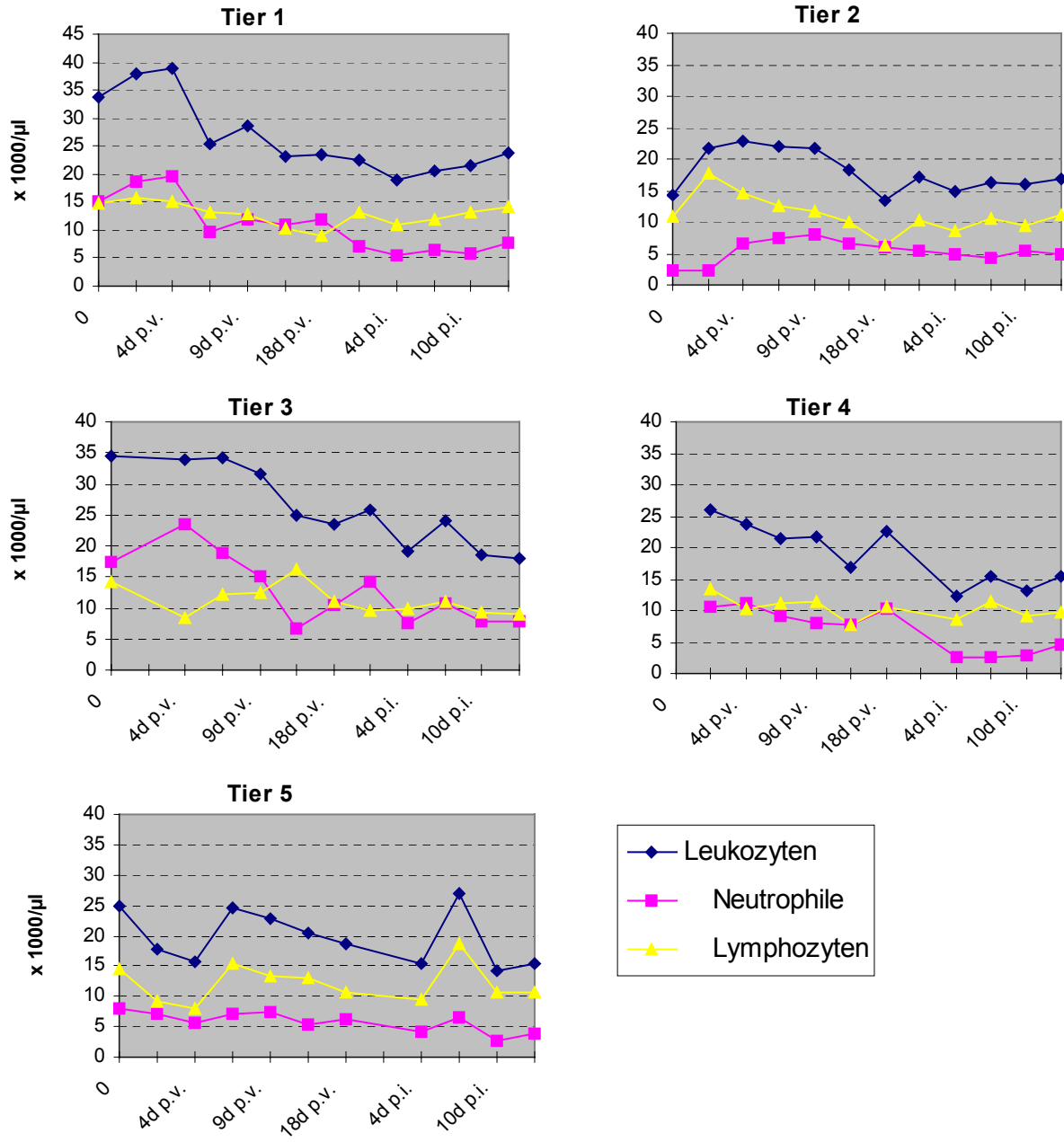
Die Untersuchungen auf das Challengevirus erfolgten am 4., 7. sowie 10. d p.i., wobei bei keinem Tier KSPV-Antigen gefunden wurde. In den am 18. d p.i. gewonnenen Organproben konnte ebenfalls kein KSPV nachgewiesen werden.

4.2.4. Untersuchungen des Blutbildes

An allen Tagen, an denen eine Untersuchung auf KSPV-Antigen stattfand, wurde auch die Gesamtzahl der Leukozyten sowie das Differentialblutbild aus heparinisiertem Vollblut bestimmt. In der Abbildung 27 ist die Entwicklung der Leukozytengesamtzahl, der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten in Bezug auf die Tage p.v. bzw. p.i. für alle

5 Tiere dargestellt. In der Literatur (Kraft et al., 1997) werden für das Schwein folgende Richtwerte für diese Parameter des weißen Blutbildes angegeben: Leukozyten 10000 bis 22000/ μl , neutrophile Granulozyten 1000 bis 9700/ μl (10 bis 46% der Leukozyten) und Lymphozyten 6000 bis 16000/ μl (49 bis 85% der Leukozyten). Auffällig ist bei den Tieren 1 und 3 eine Leukozytose in der Vakzinationsphase. Diese wurde durch eine Neutrophilie hervorgerufen, was auf eine bakterielle Infektion als Ursache hindeutet. Auch bei Tier 4 lag die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Vakzinationsphase leicht oberhalb des Normbereichs. Diese Befunde stimmen mit den Beobachtungen hinsichtlich der pathologisch-anatomischen Veränderungen überein. Die Lymphozytenzahlen bewegten sich bei allen Tieren im Normbereich, dabei bei den Tieren 2 (4. d p.v.), 3 (11. d p.v.) und 5 (7. d p.v. sowie 7. d p.i.) an den genannten Tagen an dessen Obergrenze.

Abb. 27: Blutbildparameter während des Versuchs zur Antikörperentwicklung nach oraler Immunisierung und anschließender Challengeinfektion



4.3. Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit hochvirulentem KSPV geringer Dosis

4.3.1. Klinische Symptome in der Versuchs- und Kontrollgruppe

Von den fünf vakzinierten und infizierten Schweinen der Versuchsgruppe (Tiere 1 bis 5) wurde bei den Tieren 1, 4 und 5 mit Ausnahme einer kurzzeitigen Temperaturerhöhung bei zwei dieser Schweine (vgl. Abbildung 28) keine klinische Symptomatik beobachtet.

Tier 2 zeigte ab dem 11. d p.i. eine mittelgradige und ab dem 13. d p.i. eine starke Erhöhung der Körpertemperatur (KT). Ab dem 14. d p.i. nahm das Tier kein Futter mehr auf, zeigte am 16. d p.i. hochgradige Apathie mit Zittern und Bewegungsstörungen (Ataxie, stelzender Gang, Umfallen mit Streckkrämpfen). Ferner war eine geringgradige seröse Konjunktivitis und eine schleimig-eitrige Rhinitis festzustellen. Am 18. d p.i. wurde das Tier in moribundem Zustand getötet.

Bei Tier 3 wurde ab dem 5. d p.i. eine starke Erhöhung der KT festgestellt. Ab dem 11. d p.i. stellte sich gelbbreiiger Durchfall ein. Der Allgemeinzustand des Tieres war stark gestört, schien sich dann am 13. d p.i. zu bessern, um sich einen Tag später mit Festliegen und Verweigerung der Futteraufnahme wieder zu verschlechtern. Zwei Tage später (16. d p.i.) verendete das Tier.

Die nur infizierten Tiere der Kontrollgruppe (Tiere 6 bis 8) erkrankten später als die Tiere 2 und 3 der Versuchsgruppe.

Tier 6 zeigte ab dem 23. d p.i. eine starke Erhöhung der KT und Durchfall. Ab dem 27. d p.i. ging die Futteraufnahme zurück und eine Konjunktivitis stellte sich ein. Am 33. d p.i. verendete das Tier während der Blutentnahme.

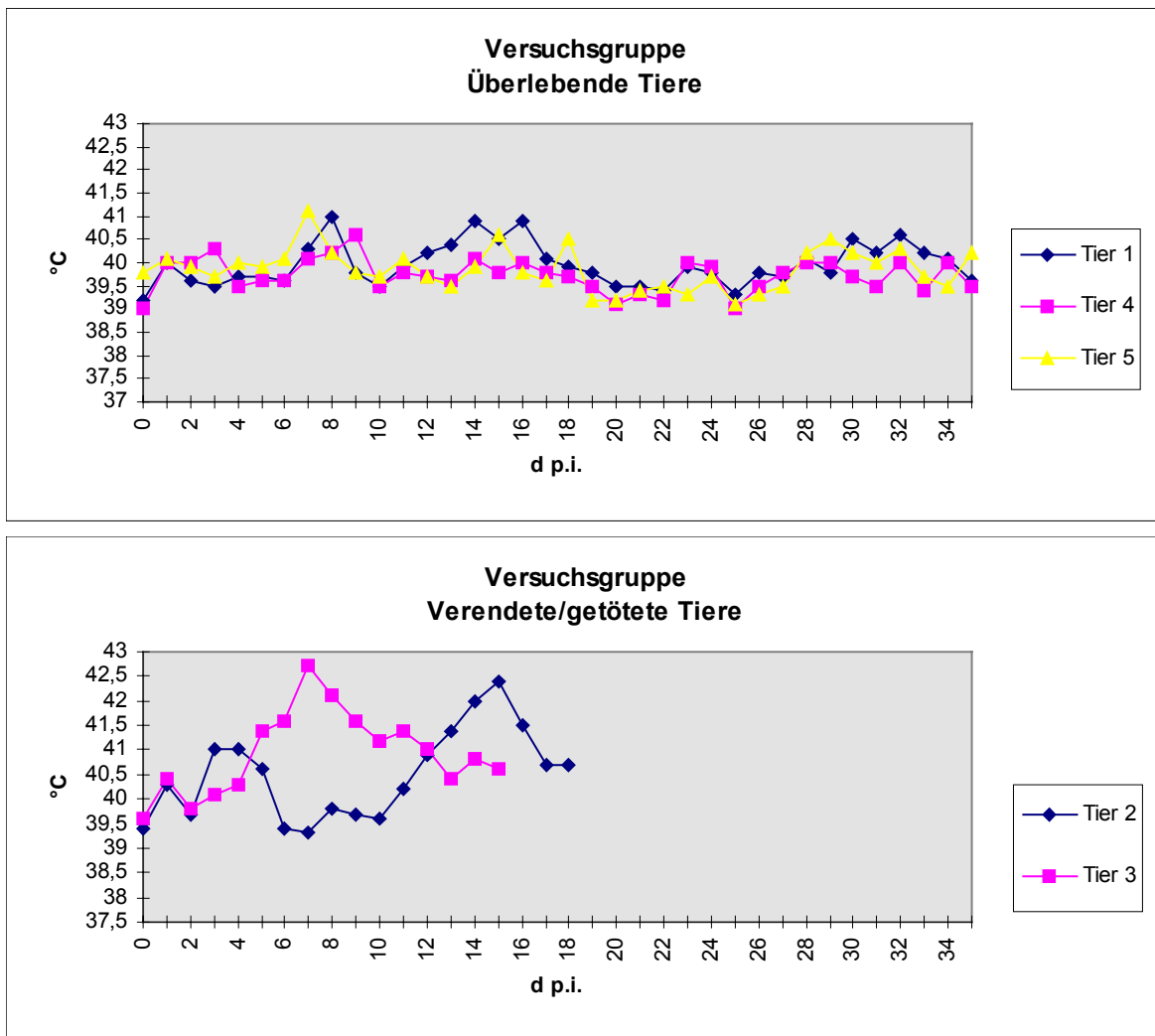
Tier 7 hatte ab dem 15. d p.i. eine stark erhöhte KT und zunächst dickbreiigen, dann dünnbreiigen Durchfall. Ab dem 18. d p.i. verweigerte das Tier zusätzlich die Futteraufnahme, zeigte am 21. d p.i. Krämpfe und Tachypnoe und verendete einen Tag darauf.

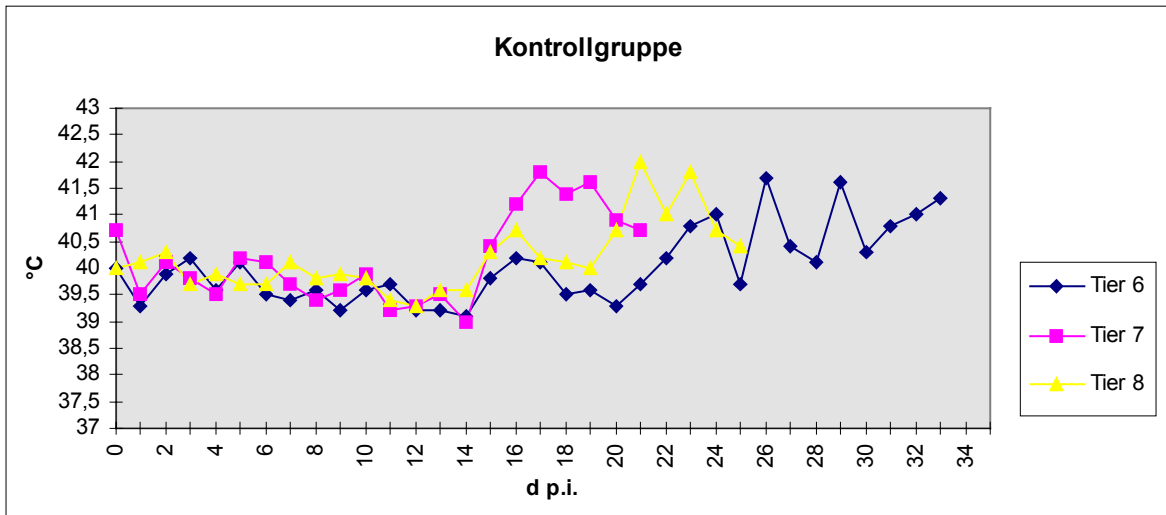
Die KT von Tier 8 war ab dem 15. d p.i. zumeist mittelgradig, ab dem 20. d p.i. stark erhöht. Ab dem 23. d p.i. stellten sich Krampfstände ein. Das Tier wurde am 25. d p.i. getötet.

In der Abbildung 28 ist die Entwicklung der KT getrennt nach überlebenden bzw. verendeten/getöteten Tieren der Versuchsgruppe und Kontrollgruppe dargestellt. Bei den Tieren 1 und 5 der Versuchsgruppe waren vom 7. bis 9. d p.i. und vom 14. bis 18. d p.i.

Temperaturen zu beobachten, die maximale Werte von 41°C erreichten (Normwerte 38 bis 40°C). Tier 4 hatte nur am 9. d p.i. eine leicht erhöhte KT. Unter den an akuter Schweinepest erkrankten Tieren der Versuchsgruppe zeigte Tier 2 ab dem 5. d p.i. eine erhöhte KT, deren Maximalwert bei etwa 42,5°C lag. Einen ähnlichen Wert erreichte auch Tier 3, allerdings erst etwa eine Woche später. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten einen Temperaturanstieg auf Maximalwerte von etwa 42°C erst nach dem 15. bzw. 20. d p.i.

Abb. 28: Verlauf der Körpertemperaturen im Versuch zur oralen Immunisierung bei gleichzeitiger Infektion der Tiere mit hochvirulentem KSPV





Fortsetzung Abbildung 28

Über die Entwicklung der Körpermasse bei den Tieren beider Gruppen gibt die Tabelle 48 Auskunft. Während eine gute Zunahme von über 16 kg bei Tier 1 und von ca. 12 kg bei Tier 4 und 5 innerhalb von 35 Tagen zu verzeichnen ist, fällt diese bei Tier 6 in etwa dem gleichen Zeitraum mit ca. 7 kg deutlich geringer aus. Die Körpermassen von Tier 2, 7 und 8 blieben etwa auf dem Ausgangsstand stehen. Tier 3 zeigte mit über 2 kg Körpermasseabnahme eine rückläufige Entwicklung. Die Mittelwerte der Körpermassen beider Gruppen zeigen sich zu Beginn sehr einheitlich mit einer Differenz von 20 g. Nach 14 Tagen beträgt diese aber schon 700 g bei einem höheren Mittelwert in der Versuchsgruppe der Tiere 1 bis 5. Zum Versuchsende hat sich die Differenz weiter auf 5030 g erhöht, obwohl bei der Versuchsgruppe die niedrigen Körpermassen der Tiere 2 und 3 mit einbezogen sind.

Tab. 48: Körpermasse im Verlauf des Versuchs zur oralen Immunisierung bei gleichzeitiger Infektion mit hochvirulentem KSPV

d p.i.	Körpermasse in kg							
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8
0	17,6	19,8	16,4	18,2	15,6	15,8	16,5	20,2
14	24,5	23,5	16,0	22,0	20,0	18	19,5	24
(d p. i.)	34,0	19,6	14,2	30	28	23	16,8	20,6
	(35)	(18)	(16)	(35)	(35)	(33)	(22)	(25)

4.3.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Tier 1 zeigte eine geringgradige katarrhalische Pneumonie und in der Schleimhaut der Harnblase vereinzelt Petechien.

Bei Tier 2 waren eine katarrhalische Pneumonie im Spitzenlappenbereich sowie geringgradig Petechien auf der Niere, in der Herzkranzfurche und submukös in der Harnblase festzustellen.

Bei Tier 3 wurde eine kruppöse Pneumonie mit geringgradiger Pleuritis und Perikarditis adhäsiva vorgefunden. Petechien in mittelgradiger Ausprägung waren in der Niere, in der Harnblase, am Myokard und in der Schleimhaut von Duodenum, Ileum, Jejunum, Colon und Caecum vorhanden. Die Tonsille zeigte nekrotische Herde in mittelgradiger Ausprägung, der Kehldeckel Ekchymosen und das lymphatische Gewebe der Ileocaecalklappe blutig-nekrotische Herde. Die Lymphknoten, insbesondere der Mandibularlymphknoten, waren blutig infarziert und markig geschwollen. Der Magen-Darm-Trakt war mit dünnflüssigem, gallegelbem bis olivgrünem Inhalt gefüllt.

Die Harnblase von Tier 4 zeigte sich diffus gerötet und die Niere marmoriert mit vereinzelter Glomerulistauung. Im Jejunum wurde eine geringgradige Schleimhautrötung festgestellt.

Tier 5 hatte in der Harnblase vereinzelt Petechien. Die Mandibularlymphknoten zeigten blutige Durchtränkung und das Jejunum eine geringgradige diffuse Schleimhautrötung.

Bei Tier 6 wurde entlang der gesamten Luft- und Speiseröhre ein Hämatom mit einem Durchmesser von ca. 3 cm festgestellt. Tonsille, Kehldeckel, Ileocaecalklappe und Mandibularlymphknoten waren blutig durchtränkt. Nekrosen waren an den Tonsillen in geringer und an der Ileocaecalklappe in starker Ausprägung vorhanden. Kehldeckel und Trachea zeigten eine starke Gefäßzeichnung und die Lunge eine mittelgradige katarrhalische Pneumonie. Außerdem enthielt sie in Parenchym und Bronchien eine blutige Flüssigkeit. Petechien wurden in der Trachea, in starker Ausprägung auf dem Myokard sowie im Parenchym der Niere und Ekchymosen am Kehlkopf und in der Schleimhaut der Harnblase festgestellt. Darm und Darmlymphknoten wiesen starke Gefäßzeichnung auf und die Darmlymphknoten waren stark geschwollen. Desweiteren war eine geringgradige Gastritis zu verzeichnen.

Bei Tier 7 wurden blutige Durchtränkungen in den Tonsillen, im Kehldeckel, in der Trachea, in den Lymphknoten und im Darm vorgefunden. Die Fundusregion des Magens war stark gerötet bei einem gallefarbenen flüssigen Inhalt. Nekrosen fanden sich in den Tonsillen in mittelgradiger Ausprägung und wenige Petechien auf dem Kehldeckel sowie in der Niere,

Ekchymosen in der Harnblase. Es waren hämorrhagische Milzrandinfarkte mit zentraler Nekrose und geringe fibrinöse Auflagerungen an der Ileocaecalklappe festzustellen. Die Spitzenlappen der Lunge wiesen eine geringgradige katarrhalische Pneumonie auf.

Die Tonsillen von Tier 8 zeigten eine harte Konsistenz, blutige Durchtränkung und in großer Anzahl nekrotische Herde. Kehldeckel und Trachea waren diffus blutig durchtränkt, ebenso die Harnblase, der Darm (insbesondere das Colon und die Ileocaecalklappe) sowie die Lymphknoten. Neben einer katarrhalischen Pneumonie der Spitzenlappen war auch eine fibrinöse Perikarditis festzustellen. An der Niere waren Petechien und Sugillationen geringen Ausmaßes vorhanden. Hämorrhagische Milzrandinfarkte wurden ebenfalls in geringem Umfang festgestellt.

Bei den Tieren 1, 4 und 5 gab es keinerlei Hinweise auf eine Schweinepesterkrankung. Vereinzelt Petechien in der Harnblasenschleimhaut und Stauungserscheinungen in anderen Organen waren tötungsbedingt.

Die pathologisch-anatomischen Befunde der Tiere 2 und 3 mit Petechien in verschiedenen Organen und Nekrosen von lymphatischem Gewebe wiesen auf eine akute Schweinepesterkrankung hin. Noch eindrucksvoller stellten sich die pathomorphologischen Veränderungen in der Kontrollgruppe dar. Hier traten neben den schon bei den Tieren 2 und 3 festgestellten Veränderungen bei den Tieren 7 und 8 zusätzlich Milzrandinfarkte und fibrinöse Entzündungserscheinungen auf. Die Befunde deuteten auf einen subakuten Verlauf der Erkrankung. Das bei Tier 6 vorgefundene Hämatom wurde durch die letzte Blutentnahme verursacht. Mit hoher Wahrscheinlichkeit lagen dem tödlichen Verlauf dieser Handlung die durch Schweinepest verursachten Gerinnungs- und Gefäßwandstörungen zugrunde.

4.3.3. KSPV-Nachweis

Über das Auffinden von Virus der KSP im Vollblut (VB), Buffy coat (BC) und Nasentupfer (NT) p.i. gibt die Tabelle 49 Auskunft. Bei dem Tier 4 der Versuchsgruppe konnte zu keinem Untersuchungszeitpunkt KSPV diagnostiziert werden. Die Virämiephasen der Tiere 1 und 5 stimmen im Zeitpunkt mit den Tagen erhöhter KT überein (vgl. Abbildung 28) und waren recht kurz. Bei Tier 5 war der Antigenbefund allerdings schon wesentlich eher positiv als bei Tier 1. Eine Virusausscheidung, zumindest über das Nasensekret, konnte bei keinem von beiden Tieren festgestellt werden. Bei den Tieren 2 und 3 dauerten die Virämiephasen über jeweils ca. eine Woche an. Sie korrelierten genau mit dem Anstieg der KT bei beiden Tieren. Tier 3 war schon 7 Tage vor Tier 2 virologisch positiv. Bei den Tieren 6 bis 8 setzten die Virämiephasen sehr viel später, nämlich erst ab dem 14. d p.i. ein. Auch hier zeigte sich eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit dem Körpertemperaturanstieg. Abgesehen von Tier 6 schieden alle erkrankten Schweine Virus über das Nasensekret aus.

Weiterhin wurden die bei der Sektion entnommenen Organproben (Milz, Niere, Mandibularlymphknoten, Darmlymphknoten, Tonsille, Lunge, Ileum, Großhirn, Kleinhirn, Ammonshorn, Pons und Medulla oblongata) auf KSPV untersucht. Dabei erwiesen sich die Tiere 1, 4 und 5 der Versuchsgruppe durchweg negativ für KSPV. Die erkrankten Tiere 2 und 3 der Versuchsgruppe sowie die drei Schweine der Kontrollgruppe waren in allen Organen KSPV-positiv. Eine Ausnahme bildete Tier 6, bei welchem im Großhirn kein Virus nachgewiesen werden konnte. Eine Bestätigung der Ergebnisse der Virusanzüchtung lieferte die RT-PCR, wobei Tonsillenmaterial zur Untersuchung kam.

Tab. 49: KSPV-Nachweis in der Versuchsgruppe (Tiere 1 bis 5) und in der Kontrollgruppe (Tiere 6 bis 8)

d p.i.	Tier 1			Tier 2			Tier 3			Tier 4			Tier 5			Tier 6			Tier 7			Tier 8		
	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT
0	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg
3	neg	neg		frag	neg		neg			neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg	
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12	neg	neg	neg	pos	neg	neg			pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	frag	neg	neg	neg	neg
14	pos	pos	neg	pos	pos	neg			pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	pos	neg
17			neg			pos						neg			neg			neg	pos	pos	neg			neg
18				pos	pos																			
19	neg	neg	neg							neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
21																	neg			pos	pos	pos	neg	
24																pos	pos	neg						pos
25																						pos	pos	
26		neg	neg								neg	neg		neg	neg		pos	neg						
33	neg	neg	neg							neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg						
35	neg	neg	neg							neg	neg	neg	neg	neg	neg									

4.3.4. Antikörperentwicklung

Der Antikörperstatus wurde bei allen Tieren am Tag der Immunisierung bzw. Infektion sowie regelmäßig ab dem 12 d p.i. kontrolliert. Der Tabelle 50 sind neben den Ergebnissen des CTB-ELISA auch die im IIFT auf PKSU erreichten Titer zu entnehmen. Zu Versuchsbeginn besaß keines der Tiere Antikörper gegen das KSPV. In der Versuchsgruppe gelang der erste Antikörpernachweis am 19. d p.i. bei den Tieren 4 und 5. Die erkrankten Tiere 2, 3, 7 und 8 blieben serologisch negativ. Tier 6, welches nach subakutem Verlauf erkrankte, erwies sich am 33 d p.i. als seropositiv, verendete aber am selben Tag nach der Blutentnahme.

Tab. 50: Antikörperentwicklung im Versuch zur experimentellen oralen Immunisierung bei gleichzeitiger Infektion mit hochvirulentem KSPV. Ergebnisse des CTB-ELISA und in Klammern des IIFT auf PKSU

d p.i.	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8
0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12	neg	neg	neg (neg)	neg	neg	neg	neg	neg
14	neg	neg		neg	neg	neg		neg
18		neg						
19	neg			pos	pos	neg	neg (neg)	neg
25								neg (neg)
26	pos			pos	pos	neg		
33	pos			pos	pos	pos (1:400)		
35	pos (>1:1600)			pos (1:800)	pos (1:800)			

4.3.5. Untersuchungen des Blutbildes

Zur Bewertung des Blutbildes wurden die Parameter Leukozytengesamtzahl, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten herangezogen. Die Diagramme der Abbildung 29 zeigen deren Entwicklung in der Versuchsgruppe, die der Abbildung 30 in der Kontrollgruppe.

Abb. 29: Blutbildparameter bei gleichzeitiger oraler Immunisierung und Infektion mit hochvirulentem KSPV

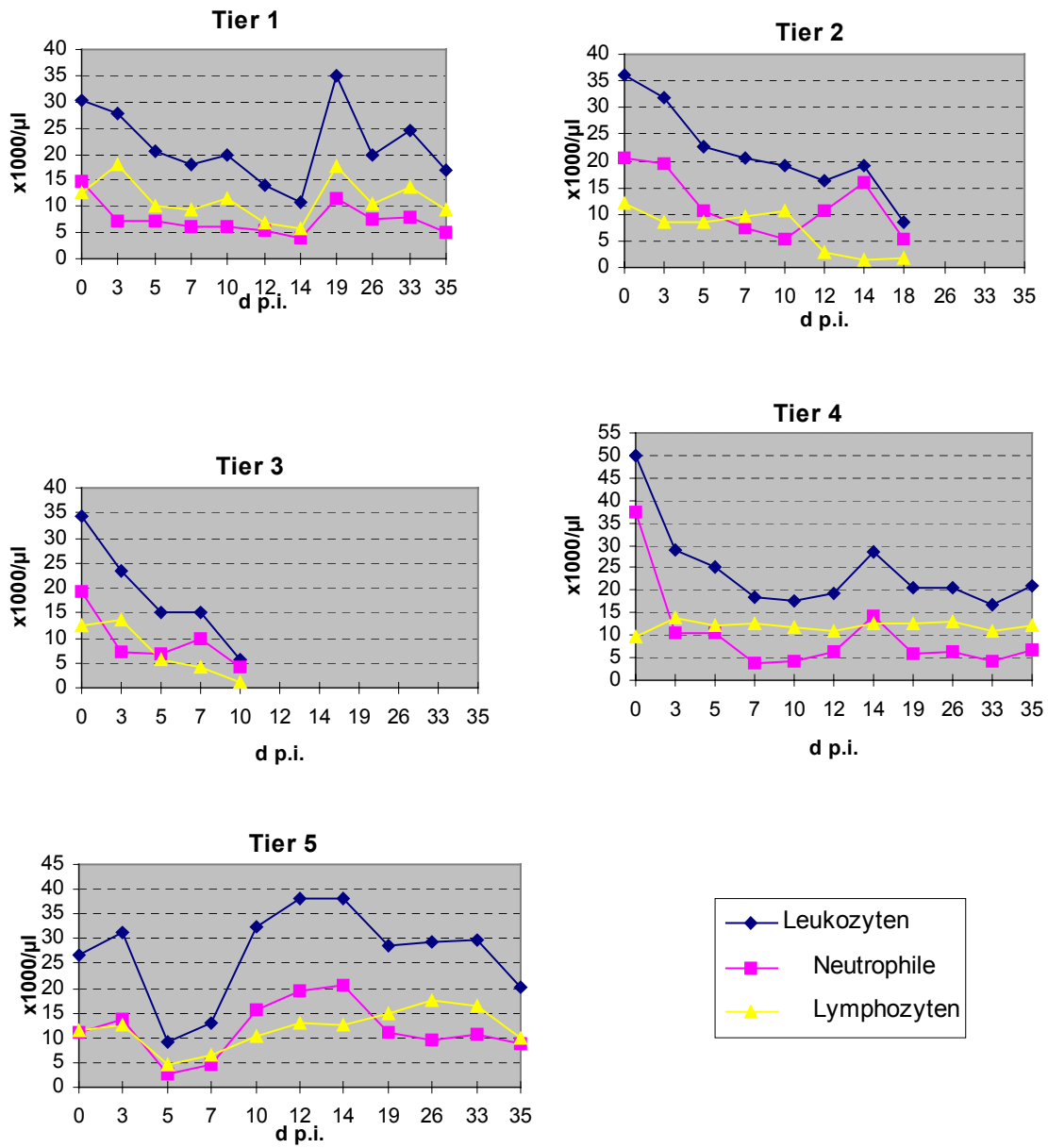
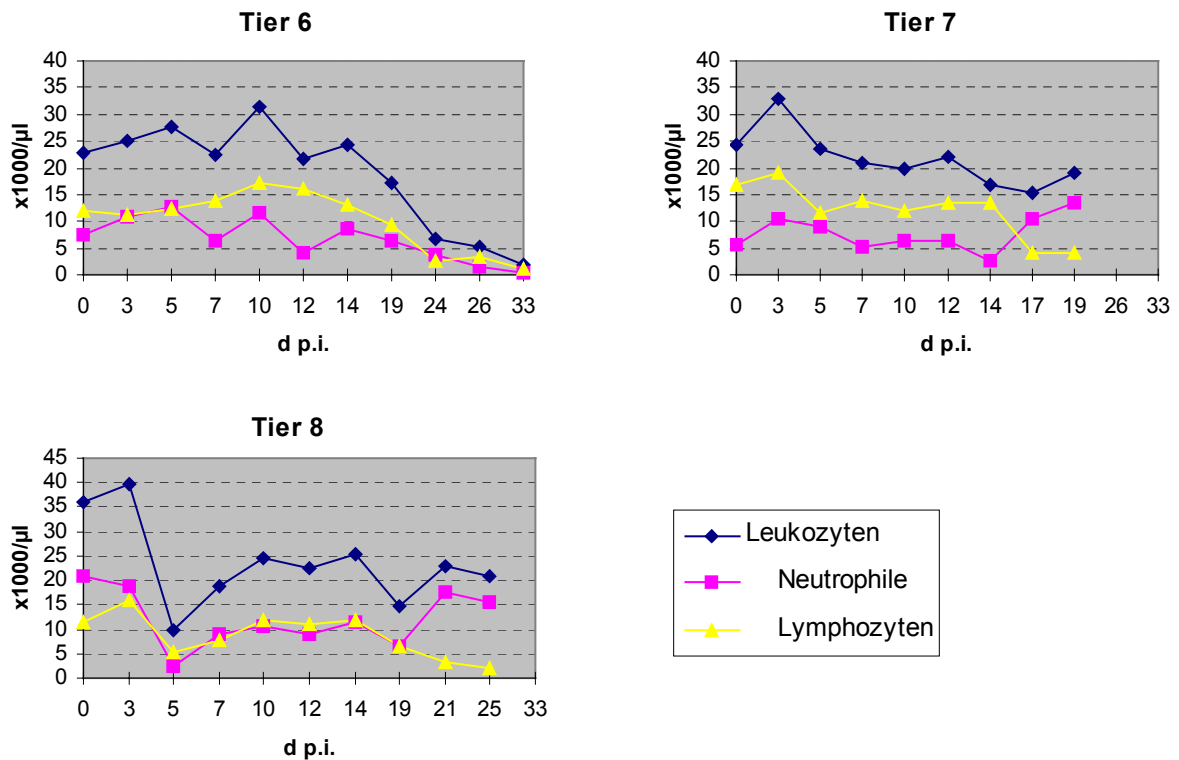


Abb. 30: Blutbildparameter in der Kontrollgruppe (nur Infektion mit hochvirulentem KSPV)



Bei den meisten Schweinen war zu Beginn oder im Laufe des Versuches eine Neutrophilie zu beobachten, deren Ursachen in bakteriellen Infektionen vermutet werden. Die Blutbildparameter der Tiere 1, 4 und 5 hielten sich annähernd im Normbereich, während bei den Tieren 2 und 3 kurz vor dem Tod ein Abfall aller drei Parameter zu registrieren war. Die gleiche Beobachtung wurde bei Tier 6 gemacht. Im Unterschied dazu bewegten sich bei den Tieren 7 und 8 die Werte am Ende gegenläufig. Dabei lagen die Lymphozytenzahlen unterhalb, die Neutrophilenzahlen oberhalb der Normwerte.

Daneben wurde an den angeführten Tagen auch die Anzahl der Thrombozyten bestimmt. Während bei den Tieren 1, 4 und 5 keine signifikante Veränderung dieses Parameters festzustellen war, fielen die Thrombozytenzahlen besonders bei den Tieren 2 und 3 deutlich und beständig ab. Bei den Tieren 7 und 8 wechselten Phasen geringerer und fast normaler Thrombozytenzahlen. Tier 6 zeigte erst wenige Tage vor dem Verenden verringerte Thrombozytenzahlen.

4.4. Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit einem schwachvirulenten KSPV-Isolat

4.4.1. Klinische Symptome

Bei den Schweinen der Kontrollgruppe (Tiere 2, 3 und 5) waren klinische Symptome sehr unterschiedlichen Ausmaßes zu beobachten.

Tier 2 zeigte lediglich am 5. d p.i. eine geringfügig verminderte Futteraufnahme, Nasenausfluß und Tachypnoe.

Bei Tier 3 wurde eine Verminderung der Futteraufnahme vom 5. d p.i. an beobachtet, die bis zum 9. d p.i. (keine Futteraufnahme) andauerte. Ebenfalls am 5. d p.i. wurden Nasenausfluß und Tachypnoe festgestellt. Ab dem 8. d p.i. zeigte das Tier eine katarrhalische Konjunktivitis, welche am 14. d p.i. eitrig wurde und am 15. d p.i. abklang. Am 8. und 9. d p.i. war Durchfall zu beobachten. Ab 17. d p.i. verstärkte sich die Konjunktivitis wieder, und es trat leichter Husten auf. Diese Symptome blieben etwa 5 Tage bestehen.

Auch bei Tier 5 setzte die Klinik am 5. d p.i. mit verringerter Futteraufnahme, Tachypnoe und Nasenausfluß ein. Am darauffolgenden Tag zeigte das Schwein zusätzlich schwankenden Gang und völlige Inappetenz. Der Nasenausfluß wurde nach 2 Tagen eitrig. Obwohl das Tier danach wieder in geringem Maße Futter aufnahm, verschlechterte sich der Ernährungszustand zunehmend. Ab dem 14. d p.i. war das Tier kachektisch. Durchfall trat am 10. und 11. d p.i., eine Konjunktivitis am 12. d p.i. und Husten einen Tag später auf. Ab dem 14. d p.i. war das Tier apathisch bei völliger Inappetenz. Am 18. d p.i. verendete das Tier.

Die Schweine der immunisierten und vakzinierten Versuchsgruppe (Tier 6 bis 10) zeigten in sehr viel geringerem Maße klinische Symptome.

Bei Tier 6 wurde am 6. d p.i. verminderte Futteraufnahme und Husten beobachtet, am 9. und 10. Tag Durchfall. Nach dem 13. d p.i., an dem nochmals Husten festgestellt wurde, blieb das Tier symptomfrei.

Tier 7 zeigte außer Husten am 6. d p.i. keine weiteren klinischen Symptome.

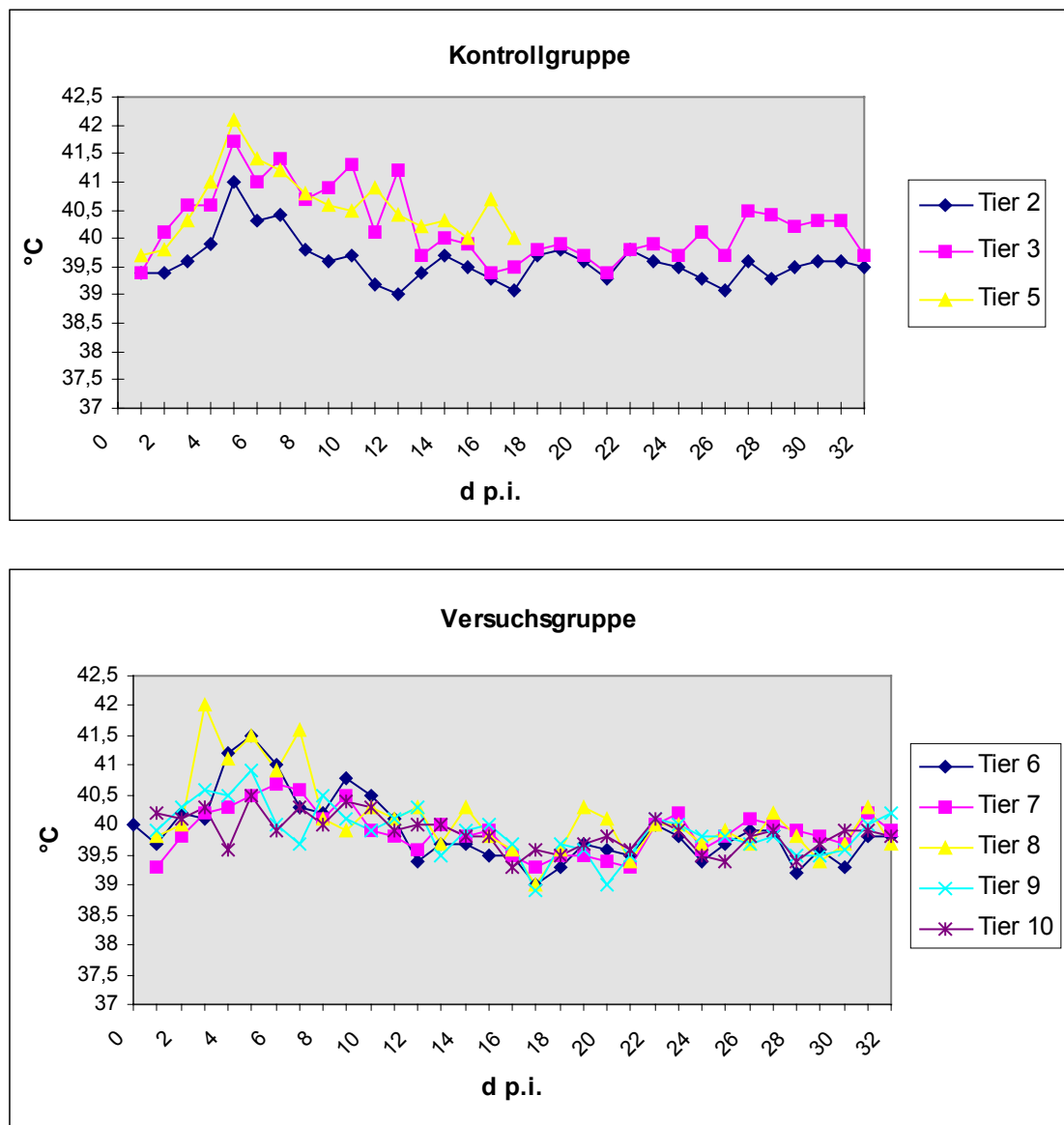
Bei Tier 8 wurde am 7. d p.i. lediglich geringgradige Apathie festgestellt.

Tier 9 zeigte am 12. d p.i. Durchfall.

Bei Tier 10 waren keinerlei klinische Symptome zu beobachten.

Die Entwicklung der Körpertemperaturen in beiden Gruppen ist aus der Abbildung 31 ersichtlich. Bei allen drei Schweinen der Kontrollgruppe erreichten die KT am 5. d p.i. ihren höchsten Wert. Für Tier 2 lag dieser bei 41°C und viel in den folgenden Tagen wieder auf normale KT ab, während bei Tier 3 der Höchstwert 41,5°C betrug und das Fieber über eine Woche anhält. Bei Tier 5 erreichte die KT Höchstwerte von ca. 42°C, ging danach zwar wieder zurück, blieb aber bis zum Verenden des Tieres erhöht. Von der Versuchsgruppe zeigten die Tiere 6 und 8 mit 41,5 bis 42°C die höchsten Temperaturwerte zwischen dem 3. und 7. d p.i. Auch bei den Tieren 7 und 9 waren, wenn auch nur leichte, Temperaturerhöhungen zu beobachten.

Abb. 31: Verlauf der Körpertemperatur nach experimenteller oraler Immunisierung und gleichzeitiger Infektion mit schwachvirulentem KSPV



Die Entwicklung der Körpermasse der Versuchstiere geht aus Tabelle 51 hervor. Während bei den Tieren 2 und 3 eine Zunahme um ca. 9 bzw. 6 kg zu beobachten war, verlor das Tier 5 innerhalb von 18 Tagen ca. 5 kg. Bei der Versuchsgruppe waren in 28 Tagen Körpermasseszunahmen zwischen ca. 7 kg (Tier 6) und ca. 12 kg (Tier 10) zu verzeichnen.

Tab. 51: Körpermasse im Verlauf des Versuchs zur oralen Immunisierung bei gleichzeitiger Infektion mit schwachvirulentem KSPV

d p.i.	Körpermasse (kg)							
	Tier 2	Tier 3	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8	Tier 9	Tier 10
0	19	20	19	17,4	16,6	17,4	14,6	18,2
7	20,2	20,9	18,4	18,3	18,3	19,6	16,7	21,1
14	23,2	21,4	16,8	19,2	19,2	20,6	17,2	22,4
18			14,8					
21	25,9	23,9		22,8	23	24,8	20,5	26,2
28	28,4	26,4		24,7	25,5	27,5	22,9	30

4.4.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Die Tiere 2 und 3 der Kontrollgruppe wurde 32 d p.i. getötet und der Sektion zugeführt. Tier 5 war am 18. d p.i. verendet.

Bei Tier 2 wurde im linken Hauptlappen der Lunge ein Abszeß vorgefunden, in dessen Bereich eine Verwachsung mit der Pleura festzustellen war. Beide Spitzenlappen wiesen eine katarrhalische Pneumonie auf. Die Schleimhaut der Harnblase wies vereinzelt petechiale Blutungen auf, die des Jejunums eine diffuse Rötung.

In der Lunge von Tier 3 war sowohl im Spitzen- als auch im Hauptlappen eine katarrhalische Pneumonie festzustellen. Auf einer Niere war eine einzelne Petechie auszumachen.

Tier 5 zeigte neben den für KSP typischen pathomorphologischen Veränderungen ebenfalls eine katarrhalische Pneumonie. Die mikrobiologische Untersuchung von Lungengewebe erbrachte den Nachweis von *Pasteurella multocida*.

Alle 5 Tiere der Versuchsgruppe wurden 32 d p.i. getötet und pathologisch-anatomisch untersucht.

Tier 6 wies im rechten Hauptlappen der Lunge einen taubeneigroßen, festen Herd mit wenig schmierigem, gelb-bräunlichen Inhalt auf. Beide Nieren hatten vereinzelte stecknadelkopfgroße, in die Tiefe ziehende anämische Infarkte. In der Schleimhaut der Harnblase fanden sich wenige petechiale Blutungen.

Bei Tier 7 waren in der Harnblase vereinzelt Petechien sowie multiple, bis ca. taubeneigroße Abszesse vorhanden, wodurch Verwachsungen mit dem Bauchfell entstanden waren.

Tier 8 zeigte vereinzelt Petechien in der Harnblase.

Tier 9 hatte in der Harnblase ebenfalls vereinzelt Petechien, die Colonschleimhaut war gebietsweise diffus gerötet und in der Magenschleimhaut zeigten sich im Fundusbereich zirkumskripte hyperämische Herde. Die Darmbeinlymphknoten waren geringgradig blutig infiltriert.

Tier 10 wies in geringem Ausmaß petechiale bis strichförmige Blutungen in der Harnblase auf.

Bei den Tieren der Versuchsgruppe gab es keine pathomorphologischen Hinweise auf eine Schweinepestkrankung. Die aufgefundenen Petechien in der Harnblasenschleimhaut sowie Stauungserscheinungen sind als tötungsbedingt anzusehen.

4.4.3. KSPV-Nachweis

In der Tabelle 52 sind die Befunde des Virusnachweises aus Vollblut, Buffy coat und Nasentupfern aufgeführt. Es ist zu erkennen, daß die Virämiephase bei allen Schweinen zeitgleich begann. In der Kontrollgruppe hielt die Virämie bei allen drei Tieren länger an als in der Versuchsgruppe. Tier 5 war über 14 Tage hinweg bis zu seinem Tod virologisch positiv. Bei Tier 9 wurde im Gegensatz zu allen anderen Schweinen mit dem Nasensekret kein KSPV ausgeschieden.

Die Virusisolierung aus den bei der Sektion am 32. d p.i. entnommenen Organproben (Milz, Niere, Mandibularlymphknoten, Darmlymphknoten, Tonsille, Lunge, Muskulatur, Zwerchfell, Pankreas, Ileum, Großhirn, Kleinhirn, Ammonshorn, Pons und Medulla oblongata) erbrachte bei allen 5 Schweinen der Versuchsgruppe (Tiere 6 bis 10) negative Ergebnisse. Aus den Organen von Tier 5 wurde KSPV isoliert, nicht aber aus den Organen der Tiere 2 und 3.

Tab. 52: KSPV-Nachweis in der Kontrollgruppe (Tiere 2, 3 und 5) und in der Versuchsgruppe (Tiere 6 bis 10)

d p.i.	Tier 2			Tier 3			Tier 5			Tier 6			Tier 7			Tier 8			Tier 9			Tier 10			
	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	VB	BC	NT	
0	frag	neg	neg	frag	neg	neg	frag	neg	neg	neg	neg	?	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
3	neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		
5	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos
10	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
12	pos	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
14			neg			neg			pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
17	neg	pos	neg	neg	neg	neg			pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
18							pos	pos																	
20	neg	neg	neg	neg	neg	neg				neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
24	neg	neg	neg	neg	neg	neg				neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
27	neg	neg	neg	neg	neg	neg				neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
32	neg	neg	neg	neg	neg	neg				neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	

4.4.4. Antikörperentwicklung

Die Bildung von Antikörpern gegen das KSPV wurde im CTB-ELISA untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 53 enthalten. In der Versuchsgruppe traten schon am 14. d p.i. bei vier Tieren und drei Tage später auch bei letztem Tier KSPV-spezifische Antikörper auf. In der Kontrollgruppe trat die Serokonversion bei Tier 2 mit geringer Verzögerung, bei den beiden anderen Tieren aber nach etwa der gleichen Zeit auf wie in der Versuchsgruppe.

Tab 53: Antikörperentwicklung nach experimenteller oraler Immunisierung und gleichzeitiger Infektion mit schwachvirulentem KSPV

d p.i.	Tier 2	Tier 3	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8	Tier 9	Tier 10
0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7				neg	neg	neg	neg	neg
14				pos	neg	pos	pos	pos
17	fragl	pos		pos	pos	pos	pos	pos
18			pos					
20	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos
24	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos
27				pos	pos	pos	pos	pos
32				pos	pos	pos	pos	pos

4.4.5. Untersuchungen des Blutbildes

Die Abbildungen 32 und 33 veranschaulichen die Entwicklung der Blutparameter Gesamtleukozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten in der Kontroll- bzw. Versuchsgruppe. Während sich in der Kontrollgruppe bei Tier 2 die Werte innerhalb des Normbereichs bewegten und bei Tier 3 die neutrophilen Granulozyten und auch Lymphozyten zeitweise oberhalb desselben lagen, war bei Tier 5 ab dem 10. d p.i. eine starke Neutropenie und Lymphopenie zu verzeichnen. Bei den Tieren 7, 8 und 9 der Versuchsgruppe war ein Anstieg der Lymphozyten am 17 d p.i. auffällig.

Weiterhin waren auch die Thrombozytenzahlen Gegenstand unserer Untersuchungen. Bei den Tieren 2 und 3 war im gesamten Versuchszeitraum keine Veränderung dieser Werte festzustellen. Bei Tier 5 fielen die Thrombozytenzahlen ab dem 5. d p.i. deutlich ab und waren ab dem 10. d p.i. auf ca. $\frac{1}{4}$ des Ausgangswertes abgesunken. Von den Schweinen der Versuchsgruppe zeigte lediglich Tier 7 intermittierend leicht erniedrigte Werte. Bei den anderen Schweinen veränderten sich die Thrombozytenzahlen nur im normalen Schwankungsbereich.

Abb. 32: Blutbildparameter in der Kontrollgruppe (nur Infektion mit schwachvirulentem KSPV)

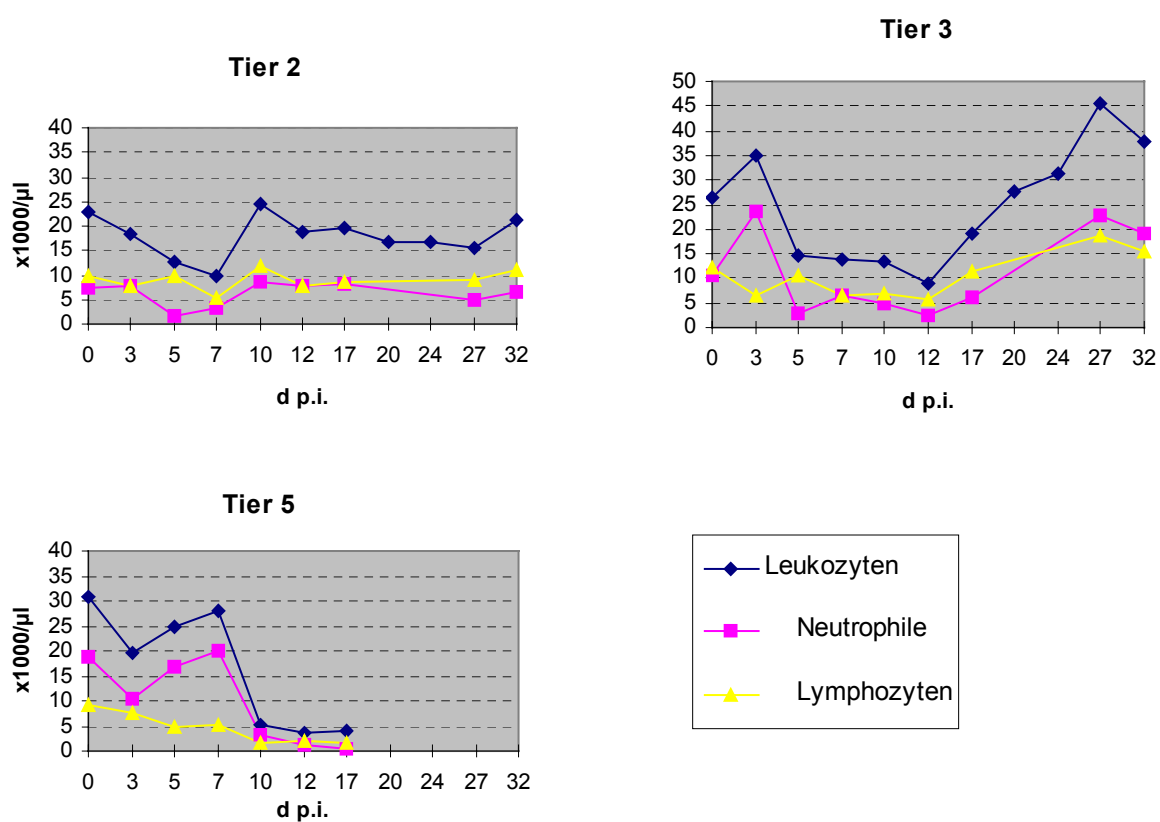
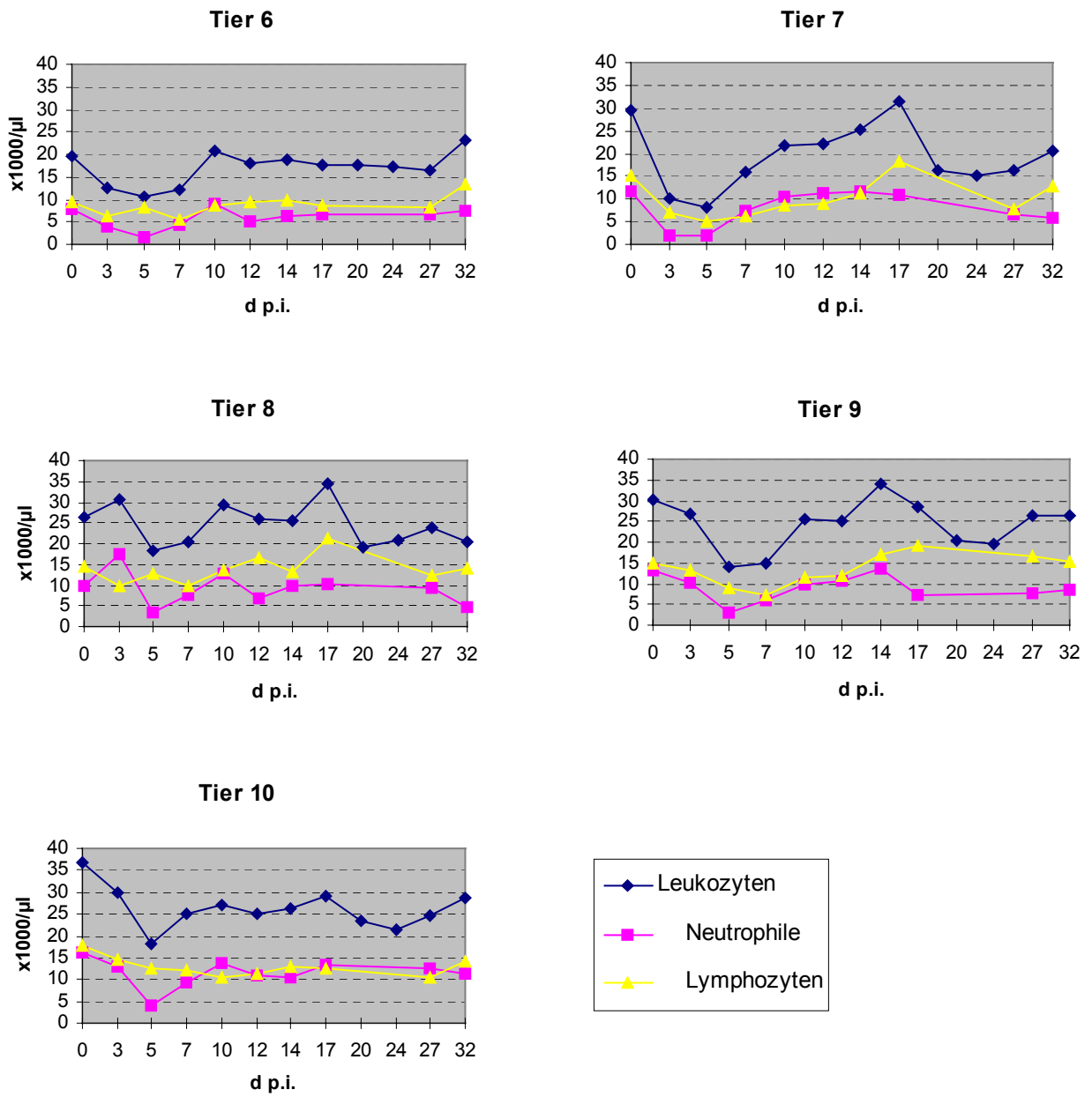


Abb. 33: Blutbildparameter in der Versuchsgruppe (orale Immunisierung und gleichzeitige Infektion mit schwachvirulentem KSPV)



5. Diskussion

5.1. Feldversuch o.I. in Mecklenburg-Vorpommern

5.1.1. Bewertung der Antikörper- und Antigenbefunde

Die Erwartungen, die wir an die Entwicklung der Antikörperprävalenzen in Mecklenburg-Vorpommern hatten, orientierten sich an der Auswertung des Pilotversuches in Niedersachsen. Dort wurden Antikörperprävalenzen von 49% nach der 1. o.I. und von 60% nach der 4. o.I. vorgefunden. Mit diesem Grad der Immunisierung konnte in Niedersachsen schon nach der 2. o.I. ein Verschwinden des KSPV aus vorher verseuchten Populationen erreicht werden (Kaden, 1996).

Eine besondere Situation wurde bei unseren Untersuchungen in Mecklenburg-Vorpommern für die Antikörperentwicklung bei den Frischlingen deutlich, welche sich nur im Jahresrhythmus betrachten läßt. Jeweils nach den Frühjahrsauslagen ließen sich in allen drei Landkreisen keine oder nur geringe Antikörperträger in dieser Altersklasse finden. Nach den Frühjahrsauslagen (2. und 4. o.I.) waren im LK Güstrow ca. 10%, nach den Herbstausslagen (1. und 3. o.I.) dagegen ca. 40% der Frischlinge Ak-positiv. Trotzdem waren in den Winterhalbjahren jeweils weniger Frischlinge positiv als Überläufer bzw. Alttiere (in der 3. Immunisierungsperiode nur halb soviel). Die Ursache hierfür ist in dem Infektionsgeschehen in diesem Gebiet zu sehen. Wie auch Depner et al. (1995) beobachteten, sind die Krankheitsverläufe beim Wildschwein wie beim Hausschwein stark vom Alter abhängig. Es ist also denkbar, daß sich einige Frischlinge mit Feldvirus infizierten, während sie noch unter dem Schutz maternaler Antikörper standen. Damit sind die gegenüber den beiden anderen Landkreisen etwas höheren Antikörperprävalenzen erklärbar. Frischlinge ohne maternale Antikörper haben bei einer Schweinepestkrankung offensichtlich kaum eine Überlebenschance und damit nicht die Möglichkeit der Ausbildung einer aktiven Immunität nach Infektion (Depner et al., 1994). Maternale Antikörper sind nur in den ersten ein bis zwei Lebensmonaten vorhanden (Tesmer et al., 1973; Mayr et al., 1984; Van Oirschot, 1994), so daß diese in den vorliegenden Ergebnissen keine größere Rolle spielen können. Die Abschlußzahlen von sehr jungen Frischlingen in den Monaten April bis Juli belegen, daß diese Tiere fast nie gestreckt wurden. Ob es sich beim Frischling MV 17 (vgl. Tabellen 26 und 27) um solch ein Tier mit maternalem Antikörperschutz gehandelt hat, muß eine theoretische Erwägung bleiben. Zur Zeit der Herbstausslagen können sich die meisten Frischlinge, jetzt im

Alter von etwa einem halben Jahr, aktiv an der Impfstoffköderaufnahme beteiligen. Auch bei einer natürlichen Infektion reagierten sie nun zunehmend mit der Bildung von Antikörpern bei möglicherweise leichteren Erkrankungsverläufen. Es war z.B. kein KSPV-positiver Frischling aus dem LK Güstrow in der 2. bzw. 4. Immunisierungsperiode serologisch positiv, wohingegen das bei fast 40% der in der 3. Immunisierungsperiode gestreckten viruspositiven Frischlinge der Fall war.

Für die Überläufer und Alttiere lagen die Einstiegswerte nach der 1. o.I. bei akzeptablen 50% Antikörperträgern. Hierbei muß von einem geringen Anteil durch natürliche Infektion erworbene Immunität ausgegangen werden, was auch durch die beiden sowohl Ag- als auch Ak-positiven älteren Tiere unterstrichen wird. Ältere Wildschweine überstanden offensichtlich eine KSPV-Infektion und bildeten Antikörper. Hinzu kam der Schutz zusätzlicher Tiere durch die o.I., wodurch sich die gegenüber den beiden anderen Landkreisen höheren Antikörperprävalenzen erklären lassen. Der in der 2. Immunisierungsperiode folgende Anstieg serologisch positiver Wildschweine sowohl bei den Überläufern auf 64% als auch bei den Adulten auf 89% bei nur 1% Ag-positiver Tiere scheint eine sehr gute Entwicklung widerzuspiegeln. Es darf aber hierbei nicht außer acht gelassen werden, daß der Frischlingsanteil an der Gesamtstrecke in diesem Zeitraum sehr gering war und die Frischlinge den Hauptanteil der Virusträger darstellen. Somit wäre es möglich, daß die durch die Untersuchung der gestreckten Stücke ermittelte Virusinzidenz nicht der wahren Virusinzidenz in der Population entspricht. Dafür spricht auch der nach der 3. o.I. wieder stark gestiegene Anteil Ak-positiver Überläufer und Alttiere, während auch fast 60% der über 5% Ag-positiven Wildschweine Ak-positiv waren. Auch die im Herbst 1995 nur einmal durchgeführte Auslage könnte zu einem verminderten Schutz der Population und damit besseren Voraussetzungen für eine Ausbreitung des Virus beigetragen haben. Einen Anhaltspunkt für diese Annahme findet man in der Entwicklungstendenz der Antikörperprävalenzen in den einzelnen Monaten der 3. Immunisierungsperiode. Der Anteil Ak-positiver Wildschweine lag im Dezember 1995, also etwa 5 bis 8 Wochen nach der Auslage und damit nach einem Zeitraum, in welchem erfahrungsgemäß die meisten oral immunisierten Wildschweine seropositiv sein müßten (Chenut et al., 1999), nur bei ca. 40%. In der Folgezeit stieg der Anteil Ak-positiver Tiere stetig an bis auf über 65% im März. Es ist davon auszugehen, daß hierfür auch das KSP-Feldvirus mitverantwortlich ist, welches bei einem Teil der Tiere Immunreaktionen induziert hat. In der 4. Immunisierungsperiode schließlich scheint sich eine Entspannung der Seuchensituation anzudeuten. Bei den Adulten

gingen die Antikörperprävalenzen um 10 bis 20 Prozentpunkte auf knapp 73% zurück. Hier ist kein positiver Effekt der o.I. ablesbar, was bei den hohen Ausgangswerten der 3. o.I. auch nicht anders zu erwarten war. Nach Hube (1998) liegt das Durchschnittsalter des Schwarzwildes in Mecklenburg –Vorpommern unter zwei Jahren und somit ist davon auszugehen, daß sich diese Alttierpopulation fast ausschließlich aus Tieren der vorherigen Überläuferpopulation zusammensetzt und der Anteil starker Bachen und Keiler, die drei Jahre oder älter sind, äußerst gering ist. An der Entwicklung in der Überläuferpopulation ist zu erkennen, daß weder infolge einer natürlichen Infektion noch als Resultat der o.I. ein Zugewinn gegenüber den Frischlingswerten erreicht werden konnte, denn die Antikörperprävalenzen blieben bei etwa 40%. Die Ursachen für den ungenügenden Immunisierungserfolg nach der 4. o.I. sind u.a. in den ungünstigen Witterungsbedingungen (starker Frost) zum Zeitpunkt der Auslage zu suchen. Einerseits wurde dadurch eine bedeckte Auslage sehr erschwert bzw. an einigen Köderplätzen unmöglich. Köderkonkurrenten hatten auf Grund der am Vormittag bzw. frühen Nachmittag erfolgten, nur teilweise bedeckten Auslagen bis zur Dämmerung und damit dem Erscheinen der Wildschweine noch ausreichend Gelegenheit, einen nicht unerheblichen Anteil an Ködern aufzunehmen. Andererseits ist das KSPV vom Stamm „C“ relativ temperaturempfindlich, insbesondere gegen wiederholte Gefrier- und Auftauprozesse (Kaden, 1993). Tagsüber kam es aber bei unbedeckter Auslage unvermeidlich zum Auftauen der Köder, während die Nachttemperaturen noch unterhalb des Gefrierpunktes lagen. Auf die Lebensfähigkeit der Vakzine und den Immunisierungserfolg hat dies einen nachteiligen Effekt. Eine Köderauslage bei stark gefrorenem Boden und / oder wechselnden Plus- und Minusgraden sowie einem geringerem Nahrungsangebot für andere Tierarten, die den Köder aufnehmen, ist somit kontraproduktiv. Unter solchen Bedingungen sollten die Auslagen besser verschoben werden. Dies ist allerdings schwierig, da auch immer jagdliche Gegebenheiten beachtet werden müssen. Auch ist für solch große Immunisierungsgebiete von mehreren 1000 km² wie in Mecklenburg-Vorpommern eine derartig kurzfristige Änderung in der Organisation nur schwer zu realisieren.

Im LK Müritz waren in der 1. Immunisierungsperiode unter den Frischlingen mit 40% die höchsten Antikörperprävalenzen und nach der 3. o.I. etwa genausoviel wie in den anderen Altersklassen zu finden, nämlich ca. 50%. Aber auch in diesem zu Beginn der Immunisierungsmaßnahmen KSPV-freien Gebiet wurden in der 1. und 3. Immunisierungsperiode einige virologisch und serologisch positive Frischlinge gefunden, so

daß nicht alle Antikörperträger nur auf die o.I. zurückzuführen sind. Die geringe Einstiegsrate der Überläufer und Alttiere im LK Müritz nach der 1. o.I. ist nicht zufriedenstellend erklärbar. Die niedrigen Antikörperprävalenzen der Alttiere sprechen in erster Linie für eine nicht durchseuchte Population. Da die Frischlinge wesentlich bessere Ergebnisse vorweisen können, liegt die Vermutung nahe, daß die erfahrenen Alttiere und Überläufer vorsichtiger waren und die Kirrungen schlechter angenommen haben. Von Januar bis März 1995 war keine Zunahme der Antikörperprävalenzen zu beobachten, so daß es trotz zweier Virusfunde keinen Hinweis auf eine schnell fortschreitende Durchseuchung gab.

Nach der 2. o.I. gab es bei den Alttieren noch immer keinen effizienten Zuwachs bei den Antikörperprävalenzen. Erst ab der 3. o.I. befanden sie sich im Aufwärtstrend, und das Ergebnis nach der 4. o.I. von 60% entspricht den Erwartungen nach dem Pilotversuch in Niedersachsen (Kaden, 1994, 1996; Hillmann und Kaden, 1995). Ausgesprochen zufriedenstellend sind die Ergebnisse bei den Überläufern nach der 2. o.I. mit 58% Antikörperträgern. Leider fallen diese in der 3. Immunisierungsperiode wieder auf 40% ab. Als Erklärung hierfür soll wieder auf die nur einmal durchgeführte Auslage während der 3. o.I. verwiesen werden, wodurch offensichtlich sehr viel weniger Tiere erreicht wurden als bei zweimaliger Auslage. Sinkende Anteile serologisch positiver Tiere sind aber auch auf die gute Eichel- und Buchelmast im Herbst 1995 zurückzuführen, wodurch die Kirrungen weniger attraktiv waren (Brendel, 1998; Hube, 1998). Ohnehin scheinen die Überläufer bei den Herbstauslagen am meisten benachteiligt zu sein. Während nämlich sowohl die Frischlinge in den LK Güstrow und Müritz als auch die Alttiere aller drei LK von der 2. zur 3. Immunisierungsperiode z.T. einen recht beträchtlichen Anstieg der Antikörperprävalenzen zu verzeichnen hatten, fielen diese Werte außer im infizierten LK Güstrow bei den Überläufern deutlich ab. Eine Erklärung könnte sein, daß die Frischlinge zu dieser Zeit z.T. noch an der Seite der Bachen und außerdem noch recht unerfahren in Bezug auf die Einschätzung von Gefahren sind und deswegen unvoreingenommener an die Kirrungen herangehen. Die Überläufer verhalten sich schon weitaus vorsichtiger beim Betreten der Kirrungen und stehen zudem in der Rangordnung hinter den Alttieren. Weiterhin fallen die Herbstauslagen in eine Zeit, in der die männlichen Überläufer die Rotte schon verlassen haben oder gerade verlassen müssen (Meynhardt, 1982). Ihnen sind die zum großen Teil von den Rotten aufgesuchten Kirrungen damit wesentlich schlechter zugänglich. In der 4. Immunisierungsperiode waren die Überläufer der 3. Immunisierungsperiode jetzt Alttiere, und dabei verbesserten sich die Immunisierungsergebnisse auf die schon erwähnten 60% Antikörperträger. Auch hier gilt, daß

diese Alttiere zum größten Teil zweijährig und somit aus der vorherigen Überläuferpopulation hervorgegangen sind. Die Antikörperprävalenzen bei den Überläufern nach der 4. o.I. sind gegenüber vorher (als Frischlinge) unverändert. Auch im LK Müritz ist der gefrorene Boden während der Auslagen der 4. o.I. als die Hauptursache für den geringen Immunisierungserfolg anzusehen. Ebenfalls sind eventuelle negative Auswirkungen der noch vorhandenen guten Futterquelle vom Herbst durch Eichel- und Buchelmast auf die Impfstoffködernaufnahme zu bedenken.

Im LK Ostvorpommern schließlich lagen die Frischlingswerte nach der 1. o.I. gleichauf mit denen der Alttiere bei ca. 40%, fielen nach der 3. o.I. aber sehr weit zurück auf nur 12%, und das auch im Vergleich mit den anderen Landkreisen.

Der Anstieg der Antikörperprävalenzen von den Frischlingen der 1. zu den Überläufern der 2. Immunisierungsperiode (47%) fiel etwas geringer aus als in den beiden anderen Landkreisen. Auch hier war ein Rückgang der Antikörperprävalenzen bei den Überläufern nach der 3. o.I. mit nur einer Auslage zu finden, ähnlich wie im LK Müritz. Der Anteil der Antikörperträger unter den Adulten bewegte sich dagegen aufwärts und lag bei über 60%. Somit wurde bei den Alttieren der angestrebte Durchimpfungsgrad erreicht, während die 3. o.I. weder bei den Frischlingen noch bei den Überläufern positive Auswirkungen zeigte. Auch nach der 4. o.I., die im LK Ostvorpommern ebenfalls unter den Bedingungen starken Frostes stattfand, stiegen die Antikörperprävalenzen bei den Überläufern gegenüber den vorherigen Frischlingen nur gering an. Bei den Alttieren ist sogar ein geringfügiger Abwärtstrend zu verzeichnen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß

- die Dynamik in der Frischlingspopulation einer besonderen Beachtung bedarf. Solange keine geeigneten Mittel gefunden sind, die Anzahl der Antikörperträger bei Tieren unter einem halben Jahr zu erhöhen, kommt nur das verschärfte Strecken dieser Altersklasse als Bekämpfungsmaßnahme in „Wildschweinpest“-gefährdeten Gebieten in Frage. Dies ist ohnehin nötig, um in absehbarer Zeit wieder eine gesunde Alterszusammensetzung zu erreichen und damit die Schwarzwildpopulation insgesamt zu stärken (Stahl, 1996; Hube, 1998).
- die Tendenzen auch bei den Überläufern nicht nur in eine Richtung verlaufen. Die Antikörperprävalenzen entwickelten sich in der 2. Immunisierungsperiode insgesamt sehr positiv, zeigten aber nach der 3. o.I. außer im infizierten Gebiet einen deutlichen

Abwärtstrend aus den schon genannten Gründen. Bei allen Überläufergruppen der 4. Immunisierungsperiode war kein positiver Effekt der Frühjahrsauslage (bei gefrorenem Boden) auszumachen. Die Antikörperprävalenzen waren gegenüber denen der Frischlingen der 3. o.I. unverändert. Unbedingt müssen also die Rahmenbedingungen stimmen, damit schon bei den Überläufern ein ausreichend hoher Impfschutz in der Population erzielt werden kann.

- die Antikörperprävalenzen bei den Alttieren den geringsten Schwankungen unterworfen waren. Trotz der bei der 3. und 4. o.I. aufgetretenen ungünstigen Umstände stieg die Anzahl serologisch positiver Alttiere noch an bzw. verblieb später zumindest auf einem einheitlichen Niveau von ca. 60%. Damit konnte bei den Alttieren der angestrebte Durchimpfungsgrad, welcher eine weitere Seuchenverbreitung verhindern kann, erreicht werden (Kaden, 1996). Von dieser Altersklasse sollten sowenig Tiere wie möglich gestreckt werden. Zur Kontrolle des Antikörperstatus dieses Teils der Population müßte eine möglichst geringe Anzahl Stichproben herangezogen werden, der Abschluß eventuell zunächst auch ganz unterbleiben.

Aus den Ergebnissen des Nachweises virologisch positiver Tiere wird sehr deutlich, daß die Frischlinge ein besonderes Problem im KSP-Geschehen darstellen. Diese Schlußfolgerung stimmt mit den Beobachtungen von Kaden und Lange (1997, 1998), Depner et al. (1998) sowie Kern (1998) überein. Das Vorhandensein intrauterin infizierter, persistent virämischer Tiere in dieser Altersklasse sowie die erhöhte Anfälligkeit junger Tiere gegenüber einer Infektion mit dem KSPV mit schweren Erkrankungsverläufen, während Alttiere u.U. nur symptomlos mit der Bildung von Antikörpern reagieren (Depner et al., 1995), sind als Ursache für diese Ungleichverteilung anzusehen. Da die Frischlinge damit die hauptsächlichste Rolle in der Verbreitung der Infektionskrankheit innerhalb der Schwarzwildpopulation und Übertragung auf Hausschweinebestände spielen, muß der Hauptschwerpunkt der Bekämpfungsmaßnahmen bei ihnen liegen. Bisher wurden aber Frischlinge im besonders kritischen Zeitabschnitt der ersten Lebensmonate durch die o.I. deutlich schlechter als ältere Wildschweine erreicht, da sie noch nicht geboren oder noch säugend bzw. die Köder für sie nicht geeignet waren und auch ihre immunologische Reaktionslage durch das eventuelle Vorhandensein maternaler Antikörper einer Antikörperbildung entgegenstehen kann (Van Oirschot, 1994). Das für die Seucheneliminierung erforderliche Strecken eines hohen Anteils junger, u.U. virustragender

Frischlinge wurde zudem nicht im notwendigen Umfang praktiziert. Verschärfend kam hinzu, daß durch einen vielfach fehlerhaften Abschluß, der nur auf die Trophäenjagd und das Strecken der stärksten Stücke orientiert ist, insgesamt eine Verjüngung der Schwarzwildpopulation eintrat (Meynhardt, 1982; Stahl, 1996; Hube 1998). Die Alterszusammensetzung entspricht bei einer solchen Bejagung nicht mehr der natürlich gewachsenen ohne Eingriff des Menschen. Durch den damit verbundenen ständig hohen Anteil junger, noch ungeschützter Wildschweine, während die älteren, größtenteils KSPV-Akpositiven in zu großer Anzahl entnommen wurden, konnte die Seuche nicht zum Stillstand kommen.

5.1.2. Antikörperprävalenzen und OTC-Nachweisrate

Mit der Verwendung von OTC als Markersubstanz wurden schon lange vor Beginn der o.I. des Schwarzwildes gegen KSP gute Erfahrungen gesammelt, so z.B. bei der Immunisierung des Fuchses gegen Tollwut in Deutschland (Stöhr et al., 1990a, 1990b). Auch beim Pilotversuch der o.I. gegen KSP in Niedersachsen hatte sich das OTC bewährt (Kaden, 1994, 1996; Hillmann und Kaden, 1995). Es war eindeutig nachzuweisen und korrelierte gut mit den Antikörperergebnissen. Voruntersuchungen zum OTC-Nachweis hatten in Niedersachsen gezeigt, daß bei gestreckten Wildschweinen keine für Tetracycline typischen Fluoreszenzen in Knochen nachzuweisen waren. Dessen ungeachtet stießen wir in Mecklenburg-Vorpommern auf größere Schwierigkeiten. Schon bald nach Beginn der Untersuchungen war festzustellen, daß die Bewertung einiger Proben selbst nach Wiederholung nicht eindeutig ausfiel. Deshalb mußten wir uns zu dem auch für uns unbefriedigenden Bewertungsmodus entschließen, der neben den klaren Aussagen „OTC-positiv“ und „OTC-negativ“ auch den Bereich der nicht eindeutigen Proben als „OTC-fragliche“ abdeckt. Die Probleme sind vor allem darin zu sehen, daß entweder Fluoreszenzen auftraten, die verwaschen und weniger typisch aussahen oder aber die gesamte Probenmatrix so starke Eigenfluoreszenz aufwies, daß die Beurteilung einer spezifischen OTC-Fluoreszenz außerordentlich erschwert war. Geringe Mengen Tetracyclin können nach Dämmrich (1969) von der Eigenfluoreszenz des Knochens überdeckt werden. Wir bewerteten Proben als OTC-positiv, wenn eine mehr oder weniger klar begrenzte, gelbe oder ausschließlich klar begrenzte grünliche Fluoreszenz mit der für OTC typischen Lokalisation vorhanden war. Fragliche Proben zeigten i.d.R. eine erhöhte Eigenfluoreszenz und bestimmte Strukturen legten die Vermutung nahe, daß dadurch eine spezifische

Fluoreszenz überdeckt sein könnte. Auch verwaschene grüne Fluoreszenzen wurden als fraglich bewertet. Stöhr et al. (1990a) teilten bei der Untersuchung unterschiedlicher Dosierungen des OTC beim Fuchs die Fluoreszenzen ebenfalls ein, und zwar in die Kategorien deutlich positiv, positiv und schwach positiv.

Im LK Güstrow fiel ein hoher Prozentsatz OTC-negativer Wildschweine auf (vgl. Abbildung 24). In der 1. Immunisierungsperiode waren sogar mehr serologisch positive Wildschweine OTC-negativ (62%) als serologisch negative (38%). Dies läßt, wie wir auch über den Virusnachweis feststellen konnten, auf ein akutes Seuchengeschehen während dieser Zeit schließen. Ein größerer Anteil der positiven Antikörperbefunde stammte nicht aus der Aufnahme des oralen Impfstoffes. In der 2. Immunisierungsperiode dagegen waren knapp 60% der Antikörperträger OTC-positiv oder zumindest -fraglich, wohingegen die gestreckten Wildschweine ohne KSPV-Antikörper zu über 71% OTC-negativ bewertet wurden. Alle Frischlinge der 2. Immunisierungsperiode waren unbeeinflusst von ihrem Antikörperstatus OTC-negativ. Am wahrscheinlichsten ist, daß es sich hierbei um maternale Ak-Träger gehandelt hat. Nur bei den serologisch positiven Überläufern korrelierten die OTC- und Ak-Befunde mit 55% OTC-positiven Tieren in größerem Umfang. Die Hälfte der serologisch positiven Alttiere konnte nur OTC-fraglich beurteilt werden. Leider setzte sich die insgesamt günstige Tendenz in den folgenden zwei Immunisierungsperioden nicht fort, sondern der Anteil OTC-negativer Tiere unter den serologisch positiven und negativen nahm beständig zu. Lediglich die Ak-positiven Alttiere waren nach der 3. o.I. zu über 50% OTC-positiv. Die seltenen OTC-Funde sind auch nicht mehr vollständig mit einem Seuchengeschehen zu erklären, da insbesondere in der 4. Immunisierungsperiode mit einer geringen Schweinepestinzidenz die OTC-negativen Tiere in allen Altersklassen überwiegen (vgl. Tabelle 19).

Dem gegenüber steht der LK Müritz, der nach der 1. o.I. mit insgesamt fast 87% OTC-positiven und -fraglichen Tieren unter den serologisch positiven in dieser Hinsicht unseren Erwartungen gerecht wurde (vgl. Abbildung 25). Aber auch unter den serologisch negativen Wildschweinen befanden sich über 55% OTC-positiv oder -fragliche Tiere. Wie aus der Tabelle 20 ersichtlich ist, wurden OTC-positiv Wildschweine insbesondere von den Frischlingen und den Adulten repräsentiert. Ähnlich erfreulich ist auch die Korrelation in der 2. Immunisierungsperiode, wobei hier der Anteil OTC-fraglicher serologisch positiver Wildschweine zugunsten der OTC-positiven abnimmt. Bei keinem Frischling wurden

Antikörper gefunden, aber immerhin wurden knapp 17% OTC-positive Tiere festgestellt. Diese hatten wahrscheinlich Teile der markerhaltigen Ködermasse aufgenommen. Unter den serologisch negativen Adulten befand sich ein großer Anteil von 57% OTC-positiver Tiere. Ab der 3. Immunisierungsperiode zeigte sich die schon im LK Güstrow beobachtete Tendenz der Zunahme des Anteils OTC-negativer Tiere. Nach der 3. o.I. wurde dies insbesondere durch die Frischlinge verursacht, wohingegen sich unter den serologisch positiven Adulten ein hoher Prozentsatz OTC-positiver Tiere befand. Es ist davon auszugehen, daß ein gewisser Anteil serologisch positiver Tiere seine Antikörper durch natürliche Infektion erhalten hat (vgl. Tabellen 35 und 36). In der 4. Immunisierungsperiode waren über die Hälfte der Ak-positiven Überläufer OTC-negativ, wohingegen die Übereinstimmung bei den Adulten immer noch zufriedenstellend ausfällt, auch wenn sie sich gegenüber den vorherigen Immunisierungen rückläufig zeigte.

Die Situation im LK OVP (vgl. Abbildung 26) stellte sich folgendermaßen dar: Die serologisch negativen Wildschweine aller Altersklassen und Immunisierungsperioden waren zum größten Teil negativ für OTC oder zumindest fraglich. Von den Ak-positiven Frischlingen waren knapp die Hälfte OTC-negativ und ca. 40% OTC-positiv. Die beste Übereinstimmung bestand bei den Ak-positiven Überläufern der 2. und 3. Immunisierungsperiode mit etwa 54% OTC-positiven. Bei den serologisch positiven Alttieren verschlechterte sich die ohnehin nicht so günstige Korrelation nach der 2. o.I. deutlich (vgl. Tabelle 24).

Die schlechten Ergebnisse des OTC-Nachweises sind nicht befriedigend erklärbar. Denkbar wäre eine Beeinflussung der Knochenfluoreszenz durch OTC-markierte Tollwutköder in den vorangegangenen Jahren oder auch die Aufnahme biologisch wirksamer Substanzen, die ein ähnliches Verhalten wie die Tetracycline zeigen und von bodenbewohnenden Mikroorganismen gebildet werden. Aber das erklärt höchstens die fraglichen, nicht aber die negativen Ergebnisse. Die Methodik des Nachweises hat sich in Vorversuchen und im Feldversuch in Niedersachsen als sehr zuverlässig erwiesen (Fischer et al., 1991a; Loepelmann und Dedek, 1991; Kaden, 1993; Loepelmann, 1994; Hillmann und Kaden, 1995; Kaden, 1996). Durch die vergleichende Untersuchung ausgewählter Proben mittels HPLC wurden viele positive Ergebnisse bestätigt, aber kein einziges negatives Ergebnis als positiv bewertet. Daß die Ergebnisse der beiden Methoden nicht vollständig übereinstimmen, kann verschiedene Ursachen haben. Der floureszenzmikroskopische Nachweis von Tetracyclinen

ist sehr sensitiv, allerdings wenig spezifisch, wohingegen deren Nachweis mit der HPLC sehr spezifisch und dafür weniger sensitiv abläuft. Aus technisch-organisatorischen Gründen war es nicht möglich, für die Bestätigung durch die HPLC Probenmaterial in größerer Menge zurückzulegen. So kamen statt der z.B. von Hesse (1985) verwendeten 10 g Knochenmaterial nur 2 g zum Einsatz. Nach der verwendeten Methode müssen mindestens 30 ng OTC / g Knochenmaterial in diesen 2 g Probe vorhanden sein, damit OTC detektiert werden kann. Bei 10 g Probenmaterial verringert sich die für den Nachweis notwendige Konzentration des Wirkstoffes im Knochen. Es muß somit davon ausgegangen werden, daß es sich bei positivem fluoreszenzmikroskopischem Nachweis und negativem Ergebnis der HPLC um ein falsch negatives Ergebnis durch die HPLC handelt. Diese falsch negativen Ergebnisse sind durch zu geringe Konzentration des OTC in der Probe bzw. durch Matrixeffekte der Probe, die das OTC überlagern, erklärbar. Die hohe Spezifität der HPLC ist am deutlichsten an der Probe MV 949 erkennbar, wo mit der HPLC Tetracyclin (TC) anstatt des OTC gefunden wurde. Die Fluoreszenz im Knochenschnitt ist bei TC und OTC völlig identisch. Die Abklärung von fluoreszenzmikroskopisch fraglichen Proben mit der HPLC führt somit nicht in allen Fällen zum richtigen Ergebnis, da bei negativem Resultat immer offen bleibt, ob nur die Konzentration der gesuchten Substanz zu gering war oder andere Substanzen der Knochenmatrix die Fluoreszenz verursachten.

In unserem Immunisierungsversuch befinden sich 150 mg OTC in einem Impfstoffköder, also genausoviel wie beim Fuchs (Stöhr et al., 1990a). Unter experimentellen Bedingungen war diese Menge ausreichend für den sicheren OTC-Nachweis in Knochen von Absatzferkeln und Jungschweinen von 50 kg Körpermasse (Fischer et al., 1991a; Kaden, persönliche Mitteilung). Unter Feldbedingungen ist die Dosis, die ein Tier aufnimmt, nicht bekannt. Ein Alttier von über 100 kg Gewicht reagiert so möglicherweise nach der Aufnahme eines Impfstoffköders mit der Bildung von Antikörpern, hat aber nur 1,5 mg OTC pro kg Körpermasse erhalten. Nach Dämmrich (1969) beträgt die notwendige Tetracyclinmenge zur Nachweisbarkeit der Fluoreszenz im Knochen 10 bis 70 mg / kg. Es ist anzunehmen, daß oftmals mehrere Köder von einem Tier aufgenommen werden. Bei einem Depot mit 5 Ködern wäre das für ein Tier mit 100 kg trotzdem noch eine zu geringe Dosis von 7,5 mg / kg, für einen Überläufer aber mit 50 kg eine akzeptable Dosis von 15 mg / kg. Demnach müßten die OTC-Nachweise vorwiegend bei den Frischlingen und Überläufern zu finden sein. Alttiere über etwa 70 kg Körpermasse dürften sich kaum unter OTC-positiven Tieren befinden. Nach unseren Auswertungen verhält es sich allerdings nicht so. Besonders im LK Güstrow sind Frischlinge

und Überläufer unabhängig von ihrem Antikörperstatus zu hohen Prozentsätzen OTC-negativ. Das gleiche läßt sich für die Frischlinge und Überläufer des Landkreises Müritz sagen, während hier die Alttiere zu großen Teilen OTC-positiv sind. Die relativ hohe OTC-Prävalenz bei älteren Wildschweinen im Vergleich zu den Jungtieren ist allerdings mit dem rangordnungsbezogenen Verhalten des Schwarzwildes bei der Nahrungsaufnahme erklärbar. Die Alttiere als ranghöchste und stärkste Wildschweine genießen einen Vorteil am Kirrplatz und nehmen nicht nur als erste, sondern i.d.R. auch mehr als einen Impfstoffköder auf. Die Benachteiligung der Jungtiere wurde insbesondere dann gravierend, wenn die Auslage der Köder auf zu kleinen Kirrungen mit zu wenig Depots erfolgte. Da sich das OTC im Köder befand und Teile von diesem unabhängig vom Impfstoff aufgenommen werden konnten, kann auch hierin eine Ursache für einen positiven OTC-Nachweis bei Ak-negativen Wildschweinen liegen.

Insgesamt erwies sich die Methode des Nachweises der Impfstoffaufnahme über den indirekten Weg der OTC-Aufnahme in diesem Versuch als nicht geeignet, die Herkunft von KSPV-Antikörpern beim Schwarzwild zu ermitteln.

Da mit dem OTC ein antibakterieller Wirkstoff zum Einsatz kam, muß auch die Rückstandsproblematik Gegenstand der Diskussion sein. Trotz der in einem Köder enthaltenen subtherapeutischen Dosis für Tiere über 10 kg KM (therapeutische Dosis beim Schwein 5 - 15 mg / kg) ist es natürlich keineswegs auszuschließen, daß einzelne Tiere wesentlich größere Mengen aufnehmen. Die Wartezeiten nach oraler Gabe betragen für die eßbaren Gewebe beim Schwein 14 Tage und für die Nieren 21 Tage (Löscher et al., 1991). Aus dieser Sicht ist also die Jagdruhe bis 10 Tage nach der letzten Köderauslage noch zu kurz bemessen. Die Problematik besteht hierbei nicht in einer unmittelbaren Gefährdung des Verbrauchers durch den Wirkstoff OTC als vielmehr in einem möglichen Beitrag zur derzeit viel diskutierten Resistenzbildung bei Mikroorganismen.

Nach der oben genannten Wartezeit ist das OTC aus den Organen eliminiert. Lediglich im Knochen liegt es dann noch längere Zeit in antibiotisch inaktiver Form vor. Wegmann (1996) fand trotz z.T. starker Fluoreszenz im Knochen kein TC in Muskulatur oder Niere. Weiterhin beobachtete er eine Diskrepanz zwischen äußerer Fluoreszenz und gemessener Konzentration der TC. Als ursächlich für die Stärke der Fluoreszenz sieht er den Zeitpunkt der letzten Applikation sowie die Stärke des Knochenstoffwechsels an.

5.1.3. Einschätzung des Immunisierungserfolges und Hinweise zu aufgetretenen Problemen

Die vorangegangenen Ausführungen zeigen, daß die o.I. der Wildschweine nicht einfach zu realisieren und von einer Reihe nicht immer kalkulierbarer Umstände abhängig ist, die den Immunisierungserfolg aber entscheidend beeinflussen können. Als solche sind u.a. zu benennen die fehlerhafte Durchführung des Immunisierungsverfahrens (offene Auslage des Köderstoffes, einmalige Auslage, zu kleine Kirr- bzw. Köderauslageplätze etc.), Witterungseinflüsse auf den Impfstoff, Konkurrenten bezüglich der Aufnahme der Köder, Fehler bei der Jagd und unzureichende Einbeziehung aller an der Jagd beteiligten Personen. Auf einige nur schwer beeinflussbare bzw. subjektive Aspekte soll nachstehend noch genauer eingegangen werden. Die weitgehende Ausschaltung anderer Tierarten, die ebenfalls den Köderimpfstoff aufnehmen, wie Fuchs, Dachs, Marder, Reh, Rabenvogel u.a., ist nur durch die konsequente bedeckte Auslage bzw. Köderausbringung in den Abendstunden möglich. Bei starkem Frost sind dem allerdings Grenzen gesetzt. Der Köderimpfstoff wurde während der 4. o.I. praktisch vollkommen ungeschützt ausgebracht, was sich sehr negativ in den Ergebnissen niederschlug. Insbesondere war dies bei den Überläufern aller drei Landkreise zu beobachten, bei denen gegenüber der vorherigen o.I. (noch als Frischlinge) kaum eine positive immunisierende Wirkung zu erkennen ist.

Deutlich negativ hat sich auch das während der 3. o.I. praktizierte Verfahren ausgewirkt, nur eine einmalige Köderimpfstoffauslage durchzuführen. Die z.T. kleinen Kirr- und Köderauslageplätze kamen als weiterer ungünstiger Faktor hinzu. Auch hierbei war, in den LK Müritz und OVP, vor allem die Überläuferpopulation benachteiligt, deren Anteil an Antikörperträgern nach diesem Immunisierungsverfahren rückläufig war.

Das Verfahren der o.I. gegen KSP baute in wesentlichen Elementen auf den Erfahrungen der o.I. des Fuchses gegen Tollwut auf. Es konnte jedoch nicht in allen Parametern übernommen werden, da sich Wildschwein und Fuchs hinsichtlich Raumnutzung und Nahrungserwerb deutlich voneinander unterscheiden. Während der Fuchs durch sein Revier streift und dieses ständig kontrolliert, so daß großflächig abgeworfene Impfstoffköder von ihm gefunden werden, verhält sich das Wildschwein grundsätzlich anders. Es ist insgesamt weniger tagaktiv und geht i.d.R. zu bestimmten Zeiten auf Nahrungssuche, dabei je nach Jahreszeit die Nahrungsquellen im Wald oder auf dem Feld nutzend. Da Schwarzwild Kirrungen als „Futterquelle“ sehr gut annimmt, ist es am günstigsten, es an einen bestimmten Kirrplatz zu

gewöhnen, auf dem dann auch die Auslage des Köderimpfstoffes stattfindet. Dies stellt insofern kein Problem dar, als daß in Schwarzwild-dichten Gebieten ohnehin Kirrungen für begrenzte Zeiträume angelegt werden. Daß an diesen oft auch der Hauptanteil der Schwarzwildstrecke erfolgt, belegen für Thüringen Abschlußzahlen von 70% (1997) an Kirrungen (Brendel, 1998). In Mecklenburg-Vorpommern wird die Strecke an Kirrungen mit 50 bis 60% beziffert (Kaden, persönliche Mitteilung). Geschieht die Auslage des Köderimpfstoffes bedeckt, so können dadurch negative Umwelteinflüsse (Sonnenschein, Temperaturschwankungen) auf den Impfstoff und um den Köder konkurrierende andere Tierarten bis zu einem gewissen Grad vermieden werden. Weiterhin entspricht diese Art der Auslage auch der Nahrungsaufnahme des Schwarzwildes.

Die Auswirkung der o.I. auf die Verminderung der Seuchenausbreitung innerhalb der Population ist während der hier betrachteten vier Immunisierungsperioden noch nicht eindeutig auszumachen. Nach einer günstigen Entwicklung in allen drei Landkreisen während der Sommermonate der 2. Immunisierungsperiode kam es in der folgenden 3. Immunisierungsperiode wieder zu einem Anstieg der Antigennachweisrate. Gleichzeitig wurde aber die Methodik der o.I. dahingehend verändert, daß nur eine einzige Auslage erfolgte. Somit liegt keine direkte Vergleichsmöglichkeit zwischen den einzelnen Auslagen mehr vor. Trotz der besonders bei den Überläufern nicht zufriedenstellenden Entwicklung der Antikörperprävalenzen in der 4. Immunisierungsperiode gab es einen rückläufigen Trend bei den Virusnachweisen.

Das Betreiben von Kirrungen führt nach unserer Ansicht nicht zu einer forcierten Verbreitung des KSPV, wenn diese fachgerecht angelegt und das Schwarzwild weidgerecht bewirtschaftet und gehegt wird. Natürlicherweise leben die Rotten in ziemlich festen Einstandsgebieten und verteidigen diese einschließlich der Futterplätze gegen fremde Rotten. Nach Pohlmeier (1998) kreuzen sich die Streifgebiete der Rotten i.d.R. nicht, sondern es wird zwischen diesen ein entsprechender Abstand gehalten. Nur bei dauernder Unruhe durch zu hohen Schwarzwildbestand oder falsche Jagdausübung kann sich nach Ansicht von Meynhardt (1982) keine Revierbindung entwickeln. Die Rotten treffen folglich vermehrt aufeinander und es gibt auch in größerem Umfang Auseinandersetzungen zwischen diesen.

In den früheren KSP-Geschehen beim Schwarzwild hat sich, bis auf Ausnahmen, gezeigt, daß die konsequente Bejagung der Wildschweine zur Populationsreduzierung führte und dadurch ein Abreißen der Infektionskette nach einem entsprechenden Zeitraum zu erreichen war. Ein verstärkter Abschluß in den „Wildschweinpest“-gefährdeten Gebieten wurde vom Ministerium

für Landwirtschaft und Naturschutz des Landes Mecklenburg-Vorpommern auch angeordnet. Leider traten bei der Durchführung der Abschlußanordnung zusätzliche Probleme auf, die den Erfolg der o.I. negativ beeinflussten. Bei Betrachtung der Abschlußzahlen des Landkreises Güstrow (vgl. Tabelle 7) fällt beispielsweise auf, daß 1995 während der Monate April bis Juni so gut wie kein Tier erlegt wurde. In den anderen Gebieten war dies ganz ähnlich. Gerade dieser Zeitraum ist aber aus seuchenhygienischer Sicht sehr bedeutsam für das angestrebte Abreißen der Infektionskette, da neugeborene Frischlinge u.U. virämisch sein können bzw. Frischlinge generell empfänglicher für das Virus sind und damit eine erhöhte Gefahr in puncto erhöhter Virusstreuung darstellen. Virämische Frischlinge können längere Zeit überleben und während dieser Zeit das Virus verbreiten. Van Oirschot (1979a) stellte bei kongenital persistent infizierten Hausschweinen Überlebenszeiten von bis zu 11 Monaten fest. Depner et al. (1995) bestätigten das Auftreten von Virämikern nach experimenteller Infektion einer tragenden Bache. Deshalb ist eine verstärkte Bejagung der Frischlinge im frühen Alter, bei besonderer Aufmerksamkeit für kümmernde oder auffällige Tiere vordringlich. Aber gerade in diesem für die Seuchenbekämpfung entscheidenden Zeitraum wurden so gut wie keine Frischlinge gestreckt, wohingegen der Anteil an Alttieren relativ hoch lag (vgl. Abbildungen 6, 10 und 14). Ein wesentlicher Grund für die unzureichende Frischlingsstrecke war, daß die Rolle der Frischlinge bei der Seuchenverbreitung in Jägerkreisen weitgehend unbekannt sowie der Abschluß von Frischlingen aus verschiedenen Gründen nicht attraktiv genug war (z.B. keine Trophäen). In den „Wildschweinpest“-gefährdeten Gebieten wurde der Frischlingsabschluß ungünstigerweise auch noch geringer prämiert als der Abschluß älterer Tiere, was sich als ausgesprochen kontraproduktiv erwies. Dabei entspricht die geforderte Altersverteilung zu streckender Wildschweine von 70% Frischlingen, 15 bis höchstens 20% Überläufern und 10% Alttieren („Lüneburger Modell“) ohnehin den aus wildbiologischer sowie -ökologischer Sicht propagierten Erkenntnissen (Stahl, 1996; Brendel, 1998; Hube, 1998). Der Anteil gestreckter Alttiere entsprach in den LK Güstrow und Müritz mit Werten um 15% in etwa den Vorgaben, lag im LK Ostvorpommern mit fast 20% aber zu hoch. Die geforderte Verteilung innerhalb der beiden Jugendklassen wurde nach Auswertung der bei uns untersuchten Proben nicht annähernd erreicht. Im LK Güstrow waren 47% der erlegten Tiere Frischlinge, im LK Müritz knapp 40% und im LK OVP sogar nur 35%. Hube (1998) bestätigt diese niedrige Frischlingsstrecke von ca. 50% für ganz Mecklenburg-Vorpommern für die Jahre 1994 - 1997. Für einen durchschlagenden Erfolg in der Seuchenbekämpfung ist das völlig unzureichend. Stahl (1996) führt an, daß in Beständen, deren Alterszusammensetzung

dem „Lüneburger Modell“ entsprach, Schweinepestseuchenherde alsbald wieder erloschen. Meynhardt (1982) weist allerdings auch darauf hin, daß niemals alle Frischlinge einer Bache gestreckt werden dürfen, soll es nicht zur Nachrausche und damit spätem Nachwuchs im Sommer kommen.

Die behördliche Abschußanordnung hat auch dazu geführt, daß vielerorts fehlerhaft gejagt wurde. So wurden durch den Abschluß von Führungsbächen Rottenstrukturen zerstört. Es kam damit zu erhöhtem Wanderverhalten der verbliebenen Rottenmitglieder, wodurch sich KSPV eher verbreiten kann, als wenn eine Rotte in ihrem Einstandsgebiet verbleibt. Weiterhin wurde so der Fortpflanzungsrhythmus der Bächen gestört. Die Folge war, daß auch eine größere Anzahl an Frischlingsbächen beschlagen (gedeckt) wurde und es über das Jahr verteilt fast ständig Jungtiere gab, die, wie schon erläutert, eine Schlüsselstellung im Schweinepestgeschehen einnehmen. Ähnliche Mängel in der Jagdausübung kritisiert auch Brendel (1998).

Die Anwendung der o.I. in Mecklenburg-Vorpommern verfolgte als Element der Seuchenbekämpfung das Ziel, durch Legen eines Impfgürtels (Cordon sanitaire) die Ausbreitung der KSP in die Peripherie zu verhindern und zu überprüfen, ob in wildschweinedichten infizierten Gebieten eine erfolgreiche Bekämpfung der KSP durch zusätzliche Anwendung der Immunisierung möglich ist. Hierzu kann folgendes festgestellt werden:

- Die o.I. hat offensichtlich zur Verbesserung der Seuchensituation beigetragen, wenngleich ein durchgreifender Immunisierungs- und damit Bekämpfungserfolg nach vier Immunisierungsperioden noch nicht zu verzeichnen war. Dies war auf Grund der Spezifität der verschiedenen Biotope, der z.T. extrem hohen Schwarzwilddichten, der noch nicht vorhandenen Erfahrung bei der Verfahrensanwendung in einem großflächigen Gebiet, welches nicht nur originäre Scharzwildwintereinstände beinhaltete, Fehlern bei der Bejagung und anderen Einflußfaktoren auch nicht zu erwarten. Variationen in der Verfahrensanwendung haben sicher nicht zur Verbesserung der Seuchensituation beigetragen.
- Ist ein angemessenes Immunisierungsverfahren erarbeitet und bleiben die Bedingungen und äußeren Umstände während der Auslagen vergleichbar, so ist mit einer positiven Entwicklung des Immunisierungserfolges zu rechnen, wie sich dies in der 2. Immunisierungsperiode andeutete. Die organisatorischen Veränderungen zur 3. o.I. und die ungünstigen Witterungsbedingungen vor allem während der ersten Auslage der 4. o.I. machen es

ausgesprochen schwierig, nach diesen vier Immunisierungsperioden eine definitive Aussage über den an den Antikörperprävalenzen gemessenen Erfolg der o.I. zu treffen. Aus unserer Sicht ist daher für den Erfolg der o.I. eine exakte Verfahrensanwendung über einen längeren Zeitraum erforderlich, bei der vor allem folgende Richtlinien beachtet werden sollten:

1. Nutzung ständig betriebener Kurrungen bzw. Anlage von neuen Kurrungen mindestens 10 bis 14 Tage vor der Köderauslage und deren Kontrolle auf Belauf durch Schwarzwild,
2. Anlage genügend großer ($\geq 200 \text{ m}^2$) Köderplätze mit mindestens 10 Depots zu je 1 bis 2 Ködern, um auch den rangniederen Tieren Gelegenheit zur Köderaufnahme zu geben,
3. konsequent bedeckte Auslagen und größere Beachtung der „Köderkonkurrenten“, damit der Immunisierungserfolg besser gewährleistet und realistischer eingeschätzt werden kann,
4. unbedingte Einhaltung der angeordneten Jagdruhe während der Zeit der Köderauslagen bis zehn Tage danach (wegen der ungestörten Aufnahme der Köder, der Rückstandsproblematik des OTC bzw. des möglichen Nachweises von Impfvirus bei gestreckten Wildschweinen),
5. weidgerechte Durchführung der jagdlichen Bekämpfungsmaßnahmen, insbesondere durch Erhöhung der Frischlingsstrecke unter Vermeidung des Abschusses von Leitbächen.

- Der Immunisierungsgürtel hat im Grund gehalten, d.h. über ihn ist kein KSPV hinausgelangt. Die notwendigen Erweiterungen des Gürtels stehen dieser Aussage nicht entgegen, wenn man berücksichtigt, daß die Erweiterung insbesondere in den Gebieten notwendig war, wo der „Impfgürtel“ bewußt in ein akutes Infektionsgeschehen hinein gelegt wurde. Auch muß davon ausgegangen werden, daß sich in bestimmten Gebieten des als virusfrei angesehenen Impfcordons bereits infizierte Wildschweine befanden, die aber aufgrund der Sensitivitätsprobleme diagnostischer Untersuchungsmethoden in der Frühphase der Infektion (Kaden et al., 1999) noch nicht als solche erkannt wurden.

- Frischlinge werden durch die o.I. nur unzureichend erreicht, wofür sowohl die Ködergröße als auch physiologische Gegebenheiten verantwortlich sind. Die Erhöhung der Bestandsimmunität durch o.I. muß also vor allem über die Überläufer und Alttiere erzielt werden. Andere Verfahrenslösungen sollten für die Frischlingsimmunisierung angestrebt werden.

- Da die o.I. nur eine ergänzende Maßnahme bei der Bekämpfung der „Wildschweinepest“ darstellt, ist insbesondere die exakte Realisierung der Bejagung potentieller Virusträger (Frischlinge) von grundsätzlicher Bedeutung.

- Die Entwicklung eines markierten Impfstoffes wäre zur Ermittlung des wahren Immunisierungserfolges wichtig, zumal die Bewertung der Aufnahme des Impfstoffes über den OTC-Marker nur mittelbare Schlußfolgerungen zuläßt.

5.2. Begleitende tierexperimentelle Untersuchungen

5.2.1. Untersuchung zur Antikörperentwicklung nach o.I. bei anschließender Challengeinfektion

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß nach einmaliger Gabe der im Köder verwendeten Dosis des Impfstoffes die Bildung von Antikörpern bei allen Läuferschweinen der Versuchsgruppe induziert wurde, wodurch alle Tiere vor einer fünf Wochen später durchgeführten Challengeinfektion geschützt waren.

Die vergleichenden Untersuchungen zwischen ELISA und IIFT zum Nachweis der KSPV-Antikörper (vgl. Tabelle 46) widerspiegeln deutlich die Vor- und Nachteile beider Methoden. Während Proben im IIFT bereits positiv reagierten, war das Ergebnis im ELISA noch fraglich bzw. sogar negativ. Vom IIFT ist eine höhere Sensitivität als vom ELISA zu erwarten, da der IIFT alle pestivirus-spezifischen Antikörper des Testserums detektiert. Im Unterschied dazu basiert der ELISA auf der Anwendung zweier mAk und eines Hüllproteins des KSPV und erfaßt damit nur Antikörper des Testserums mit homologer Epitopspezifität (Wensvoort et al., 1988). Diese wesentlich höhere Spezifität geht mit Sensitivitätseinbußen einher. Nach Kaden (1993) ist der IIFT außerdem geeignet, eine Bewertung der protektiven Wirkung von Antikörpern nach oraler Immunisierung vorzunehmen. Bei einem Antikörpertiter von $\geq 1:200$ im IIFT ist von einem Schutz der immunisierten Schweine auszugehen. Ein sicherer Nachweis der Serokonversion ist nach unseren Ergebnissen nicht vor Ende der dritten Woche p.v. zu erwarten. Dies stimmt weitgehend mit anderen Untersuchungen zum frühestmöglichen Antikörpernachweis nach einer parenteralen bzw. oralen Immunisierung gegen KSP überein (Mayr et al., 1984; Dahle und Liess, 1995; Chenut et al., 1999). Da eine ganze Reihe von Arbeiten (Wittmann et al., 1972; Kaden und Glaner, 1982; Glaner et al., 1984; Kaden et al., 1985; Dahle und Liess, 1995) darauf hinweisen, daß sowohl parenteral als auch aerogen immunisierte Hausschweine schon nach etwa einer Woche und damit lange vor dem Nachweis der Antikörper gegen eine KSPV-Infektion geschützt sind, bleibt dieser Aspekt auch für die orale Immunisierung abzuklären.

In Auswertung der experimentellen o.I. ist erkennbar, daß in den ersten Tagen p.v. ein Nachweis des Impfvirus möglich sein kann, welches aber offensichtlich nicht ausgeschieden wird (Wittmann et al., 1972; Fischer et al., 1991). Nach einer Provokationsinfektion wurde weder KSPV im Tier selber noch in dessen Nasensekret festgestellt, so daß prophylaktisch immunisierte Tiere als Virusüberträger epidemiologisch keine Rolle spielen (Dahle und Liess, 1995; Chenut et al., 1999). Klinische Symptome oder Wachstumsverzögerungen waren nach der Infektion ebenfalls nicht vorhanden (Chenut et al., 1999). Veränderungen des Blutbildes wurden weder durch Immunisierung noch durch Infektion hervorgerufen. Bei den Tieren 1 und 3, welche zeitweise eine Neutrophilie aufwiesen (vgl. Abbildung 27), spielten ganz offensichtlich bakterielle Pneumonien eine Rolle.

Die Methode der o.I. ist daher grundsätzlich geeignet, vorbeugend immunisierte Schweine, d.h. auch Wildschweine, gegen eine Infektion mit KSPV wirkungsvoll zu schützen. Als mögliche Überträger des KSP-Feldvirus sind solche Tiere nicht anzusehen.

5.2.2. Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit hochvirulentem KSPV geringer Dosis

Da auch in infizierten Gebieten immunisiert wurde, stellte sich mit Beginn der Auswertung des Feldversuches in Mecklenburg-Vorpommern die Frage, welche Auswirkungen die o.I. in den „wildschweinpest“-gefährdeten Gebieten auf die Seuchensituation haben könnte. Es galt zu überprüfen, ob diese möglicherweise sogar noch dadurch verschärft wird, daß sich Wildschweine zeitgleich zur o.I. mit einer Infektion auseinandersetzen müssen.

In der experimentellen Studie, wobei die Infektion mit hochvirulentem KSPV geringer Dosis erfolgte, zeigte sich, daß infizierte bzw. gleichzeitig vakziniert–infizierte Tiere höchst unterschiedlich reagierten. Trotz der sehr niedrigen Infektionsdosis erkrankten letztlich alle Läufer Schweine der Kontrollgruppe (Infektionskontrollen) an typischer Schweinepest. Lediglich der Beginn der Erkrankung wurde mit Inkubationszeiten von 15 bzw. 23 Tagen nach hinten verschoben. Die Krankheitsdauer lag dabei zwischen 6 und 10 Tagen. Bei zwei immunisierten und infizierten Tieren betrug die Inkubationszeit 5 bzw. 11 Tage bei einer Krankheitsdauer von 11 bzw. 7 Tagen. Diese beiden Tiere erkrankten somit schneller als die der Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung für diese Verkürzung der Inkubationszeit könnte eine Sensibilisierung der Tiere gegenüber der Infektion durch die gleichzeitige Vakzination sein, wie sie auch von Mayr et al. (1984) für eine Immunisierung mit einer zu geringen Dosis

erwähnt wird. Die klinische Symptomatik war bei allen erkrankten Tieren sehr ähnlich. Eine Virusausscheidung über das Nasensekret wurde bei den beiden erkrankten Tieren der Versuchsgruppe und bei zwei Tieren der Kontrollgruppe gefunden. Ein Tier der Kontrollgruppe, welches erst nach einer Inkubationszeit von 23 Tagen erkrankte, war zwar virämisch, schied aber zumindest über das Nasensekret kein KSPV aus.

Drei andere Schweine der Versuchsgruppe (60%) überlebten die gleichzeitige Vakzination und Infektion. Sie zeigten außer einem kurzzeitigen Anstieg der Körpertemperaturen keine weiteren Symptome. Aus Vollblut und Buffy coat von zwei dieser Tiere konnte für kurze Zeit KSPV reisoliert werden. Das Virus wurde aber niemals mit dem Nasensekret ausgeschieden. Antikörper traten bei diesen drei Tieren erstmals gegen Ende der 3. Woche auf. Auf welchen Immunmechanismen dieser völlig andere Infektionsverlauf beruht, bleibt abzuklären. Denkbar ist die Beteiligung einer Virusinterferenz, die auch von Wittmann et al. (1972) für die frühe Schutzwirkung einer Immunisierung verantwortlich gemacht wurde. Kaden et al. (1985) und Kaden (1993) führten einen frühen Infektionsschutz noch vor Auftreten der Antikörper auf Virusinterferenz, Interferonwirkung und zellvermittelte Immunmechanismen zurück.

In diesem Zusammenhang sind die Versuche von Urbaneck et al. (1973) zur metaphylaktischen Immunisierung von Hausschweinen mit KSP-Lebendvirusvakzine anzuführen, bei denen die Tiere allerdings parenteral immunisiert wurden und die subkutan verabreichte Virusdosis (10^6 ID₅₀) wesentlich höher war als in unserem Versuch. Mehrere Versuchsgruppen mit unterschiedlichem Infektions- und Immunisierungsschema wurden zusammengestellt. In einer Gruppe starben alle infizierten und einen Tag später vakzinierten Tiere an KSP. In einer anderen Anordnung wurden einige Tiere einer Gruppe infiziert und, als diese erkrankt waren, die restlichen Tiere immunisiert. Alle Schweine mit Krankheitserscheinungen wurden aber sofort aus der Gruppe entfernt, so daß der Infektionsdruck geringer war. Auf diese Weise konnten 40% der immunisierten Schweine geschützt werden. Auch hierfür wurde Virusinterferenz verantwortlich gemacht. Dieser Ansatz ist am ehesten mit unserem Versuch vergleichbar. Die Versuche von Urbaneck et al. (1973) lassen vermuten, daß bei höherer Infektionsdosis weniger oral immunisierte Schweine geschützt wären.

Die überlebenden, oral immunisierten Schweine wiesen bei zeitgleicher Infektion eine temporäre Virämie auf, ohne daß Virusausscheidung im Nasensekret festgestellt werden konnte. Da zu späteren Zeitpunkten alle Versuche eines Virusnachweises negativ ausfielen, muß davon ausgegangen werden, daß in freier Natur vakziniert-infizierte und überlebende

Wildschweine wahrscheinlich keine persistent infizierten Virusträger bilden. Dies ist insbesondere in Gebieten wichtig, in denen die o.I. angewandt wird, ohne daß der Verseuchungsgrad genau bekannt ist. Beachtet werden muß hierbei jedoch, daß diese Aussage unter Anwendung einer sehr geringen Infektionsdosis getroffen wurde. Aber auch Urbaneck et al. (1972) konnten bei keinem ihrer Versuche eine Persistenz des KSPV nachweisen.

In den Blutbildern der Kontrollgruppe ist besonders die Lymphopenie auffällig. Bei den Tieren 7 und 8 trifft deren Beginn mit dem ersten Auftreten klinischer Symptome zusammen. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten nimmt dagegen sogar zu. Bei Tier 6 waren schon vier Tage vor Beginn der klinischen Erscheinungen unter das Ausgangsniveau fallende Werte sowohl bei den Lymphozyten als auch bei den neutrophilen Granulozyten zu verzeichnen. Bei den überlebenden Absatzferkeln der vakziniert-infizierten Versuchsgruppe war auffällig, daß bei den Tieren 1 und 5 Virus an den Tagen nachgewiesen werden konnte, an denen auch die Lympho- und Neutropenie ihren Tiefstpunkt erreicht hatte. Danach stiegen beide Werte wieder steil an. Bei Tier 4, bei dem kein Virus reisoliert wurde, blieben die Lymphozyten in einem sehr engen Wertebereich. Bei den Tieren 2 und 3 war, ganz ähnlich wie bei den Tieren 7 und 8, die fortschreitende Lymphopenie mit einer vorübergehenden Zunahme der neutrophilen Granulozyten gekoppelt. Šuša et al. (1992) fanden ähnliche Ergebnisse in ihrer Arbeit.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß je nach individueller Veranlagung der Schweine eine gleichzeitige Immunisierung und Infektion zu einer Forcierung des Krankheitsgeschehens oder aber einer Verhinderung der Erkrankung führen kann. Welche Immunmechanismen hierbei eine Rolle spielen, ist noch genauer abzuklären. Der positive Aspekt hierbei ist, daß einige Tiere in den „Wildschweinpest“-gefährdeten Gebieten trotz Infektion zeitgleich mit der Vakzination möglicherweise nicht erkranken und kein Virus ausscheiden und somit auch auf diese Weise der Seuchenverbreitung entgegensteuern. Im Gegensatz dazu kann es im direkten Anschluß an die o.I. bei gleichzeitiger Infektion auch zu gehäuften Krankheitsfällen kommen, die aber nicht zu dem falschen Schluß verleiten dürfen, daß sie ohne o.I. nicht eingetreten wären.

Aus den experimentellen Untersuchungen zur o.I. sowie früheren Arbeiten zu protektiven Eigenschaften der Schweinepest-Lebendvirusvakzine vom Stamm „C“ bei verschiedenen Applikationsmethoden (Wittmann et al., 1972, Urbaneck et al., 1973; Kaden und Glaner, 1982, Kaden et al., 1985, Kaden, 1993) geht hervor, daß ein sicheres Wirksamwerden der o.I. nur gegeben ist, wenn die Immunisierung wesentlich vor der Infektion, d.h. mindestens zwei

Tage früher, stattfindet. So können auch Virusausscheider nach Immunisierung verhindert werden.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, daß die o.I. nur in „wilschweinpest“-freien Gebieten um den infizierten Bezirk zum Einsatz kommen sollte (Kaden und Lange, 1998). Dieses Grundprinzip der Immunisierung von gesunden, nicht in der Inkubationszeit befindlichen Tieren wurde auch in Mecklenburg-Vorpommern mit der Anlage des ca. 25 km breiten Impfgürtels angestrebt. Da sich kurz nach Beginn der o.I.-Maßnahmen in einigen Teilgebieten des Impfgürtels eine vorher nicht bekannte Verseuchung herausstellte, wurden mehrere Anpassungen des Impfgebietes vorgenommen. Auch das Auftreten der Schweinepest in angrenzenden Landkreisen Brandenburgs beeinflusste diese Veränderungen (siehe Anlage 2).

5.2.3. Wirksamkeit der o.I. bei gleichzeitiger Infektion mit einem schwachvirulenten KSPV-Isolat

Nach der Isolierung eines KSPV, welches erst nach zwei Passagen in der Zelllinie PK-15 nachweisbar war und sich in ersten Infektionsversuchen als schwachvirulent herausgestellt hatte (Kaden et al., 1997), stellten wir uns die Frage, wie eine Erkrankung nach experimenteller Infektion mit diesem Virus verläuft und wie diese durch eine gleichzeitige o.I. beeinflusst werden kann.

Die klinischen Erscheinungen der drei Tiere der Infektionskontrollgruppe differierten recht stark. Sie reichten von kaum bemerkenswerten Symptomen an lediglich einem Tag bei Tier 2 über eine mehr als zwei Wochen andauernde moderate Erkrankung mit anschließender Rekonvaleszenz bei Tier 3 bis hin zu schwersten klinischen Symptomen mit tödlichem Ausgang bei Tier 5. Übereinstimmend war aber die Inkubationszeit von ca. 5 Tagen. Bei allen Tieren konnte Virusausscheidung festgestellt werden, deren Dauer mit der Stärke der klinischen Symptome korrelierte. Bei Tier 2 ging die Virämiephase mit einer Neutropenie einher, wobei keine Veränderungen der Lymphozytenwerte festgestellt wurden. Tier 3 zeigte eine ca. 7tägige geringe Neutropenie und Lymphopenie, welche synchron mit der Virämiephase abliefen. Bei Tier 5 erfolgte erst ein geringfügiger Rückgang der Lymphozyten und nach dem 7. Tag ein völliger Einbruch bei Neutrophilen und Lymphozyten. Bei allen drei Tieren war der Antikörpernachweis am 17. bzw. 18. Tag p.i. positiv.

Unterschiedliche Erkrankungsverläufe, so auch die atypischen Verlaufsformen wie bei den Tieren 2 und 3, sind bei der Schweinepest nicht ungewöhnlich. Individuelle Unterschiede und

die allgemeine Reaktionslage der Tiere können dazu führen, daß mit einem Isolat und derselben Infektionsdosis die auch hier beobachteten Unterschiede im Erkrankungsverlauf auftreten können (Depner et al., 1996; Kaden et al., 1997). Van Oirschot (1992) macht darauf aufmerksam, daß gerade bei schwachvirulenten Virusstämmen Wirtsfaktoren eine größere Rolle für den Krankheitsverlauf spielen als bei hoch- oder avirulentem KSPV. Die hohen Ausgangswerte der neutrophilen Granulozyten von Tier 5 geben einen Hinweis auf eine mögliche bakterielle Belastung zum Zeitpunkt der Infektion (vgl. Abbildung 32), welche sich zwar nicht in klinischen Symptomen äußerte, aber dennoch zum heftigen Verlauf der Schweinepesterkrankung beigetragen haben könnte.

Die fünf Tiere der vakziniert-infizierten Versuchsgruppe zeigten nur für kurze Zeit geringgradige unspezifische Symptome. Ein Tier hatte keinerlei Krankheitszeichen. Die Virämiephase setzte bei allen Tieren am 5. Tag p.i. ein. Am 10. Tag p.i. waren alle Tiere wieder virusfrei. Bei einem Tier wurde kein KSPV im Nasensekret nachgewiesen. Die Veränderungen im Blutbild begannen bei einigen Tieren schon am 3. Tag p.i. und waren am 5. Tag p.i. am ausgeprägtesten. Am auffälligsten war hierbei die Neutropenie. Leichte Lymphopenien wurden bei Tier 7 und 9 registriert. Antikörper konnten bei vier Tieren schon am 14. Tag p.i. und am 17. Tag auch bei Tier 7 nachgewiesen werden.

Die Erkrankungsverläufe bei den Tieren der Kontrollgruppe beweisen, daß es sich bei dem Isolat um ein schwachvirulentes Schweinepestvirus handelt. Dabei muß auch bedacht werden, daß die Infektionsdosis mit $10^{5,2}$ KID₅₀ sehr hoch war. Zwei von drei Absatzferkeln erkrankten mit nur leichten Symptomen, und das verendete Tier 5 befand sich gleichzeitig unter der Belastung einer *Pasteurella-multocida*-Infektion. Auch unter Feldbedingungen hätten die beiden nur leicht erkrankten Tiere gute Chancen gehabt, die Infektion zu überleben.

Bei gleichzeitiger o.I. und Infektion mit schwachvirulentem KSPV scheint es, eventuell bedingt durch unspezifische Immunmechanismen oder Virusinterferenz, zu einer weiteren Abschwächung der pathogenen Eigenschaften des Virus zu kommen. Es ist davon auszugehen, daß bei vorliegender Konstellation der Einbruch eines solchen Virus in eine gleichzeitig vakzinierte Population zunächst vollkommen unerkant bleiben kann, da es derzeit noch keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Impfvirus- und Feldvirus-induzierten Antikörpern gibt. Wie bereits gezeigt wurde, hat sich auch die Markierung des Köders mit OTC nicht als hinreichend sicher erwiesen. Eine Virämiephase tritt bei zeitgleich vakzinierten und mit schwachvirulentem KSPV infizierten Schweinen nur für kurze Zeit oder z.T. intermittierend auf (Depner et al., 1996; Kaden et al., 1997, 1999). Da aufgrund der

Jagdruhe nach den Köderimpfstoffauslagen ohnehin nicht gestreckt und damit virologisch untersucht wird, werden solche Infektionen u.U. nicht erkannt und das Virus kann sich unerkannt ausbreiten. Wahrscheinlich verursacht es zunächst auch in der ungeimpften Population nur schwache klinische Verläufe mit anschließender Antikörperbildung, bevor auffallende klinische Symptome unter Streßeinfluß wie etwa bei Tier 5 oder durch Virulenzsteigerung infolge von Passagen des Virus im Schwein (Dunne, 1975) beobachtet werden. Daher muß in den Immunisierungsgebieten ganz besonderes Augenmerk auf die Erkennung von infizierten Tieren durch Virusisolierung gelegt werden, d.h. alle gestreckten Wildschweine sollten in solchen Gebieten auch virologisch untersucht werden.

5.3. Methodische Anmerkungen

In der vorliegenden Arbeit lassen sich an verschiedenen Stellen Differenzen zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden des Antikörpernachweises (CTB-ELISA und IIFT auf PKSU) feststellen. Im Tierversuch zur Antikörperentwicklung nach o.I. war der IIFT wesentlich früher positiv als der CTB-ELISA, was mit der größeren Spezifität des ELISA zusammenhängt. Der IIFT besitzt zwar eine größere Sensitivität (vgl. Tabelle 46), was sich aber insofern nachteilig auswirken kann, als daß auch nicht-KSPV-spezifische Antikörper detektiert werden. Diese können nach einer Infektion von Schweinen mit anderen Pestiviren, z.B. BVDV, auftreten, da diese Viren antigenetisch nahe verwandt sind und es somit zu Kreuzreaktionen kommt (Darbyshire, 1960; Moennig und Plagemann, 1992). Im Tierversuch kann dieser Aspekt außer acht gelassen werden, da die Schweine zu Beginn im IIFT negativ waren. Bei Wildschweinen muß dies allerdings immer bedacht werden, da ein gewisser Prozentsatz mit BVDV infiziert ist. Deshalb wurden die Ergebnisse des IIFT auch nur in den seltenen Fällen von wiederholt fraglichen Ergebnissen im CTB-ELISA zur endgültigen Bewertung herangezogen. Weiterhin traten, und zwar ausschließlich bei Serumproben von Wildschweinen des Feldversuchs o.I., Fälle auf, in denen ein eindeutig positives Ergebnis des CTB-ELISA im IIFT nicht bestätigt wurde (siehe z. B. Tabelle 36). Möglicherweise hängt dies mit der z.T. recht mangelhaften Qualität der Serumproben gestreckter Wildschweine zusammen, wodurch letzteres Testsystem u.U. beeinträchtigt wurde.

Bei einem Wildschwein (vgl. Tabellen 35 und 36) konnte KSPV im Knochenmark nachgewiesen werden, wohingegen in der Zellkultur eine Virusisolierung nicht gelang. Dies kann einerseits ein Hinweis auf wenig Virus im Ausgangsmaterial sein. Der IIFT im

Knochenmark stellt einen Direktnachweis des Virus ist, wohingegen sich das Virus erst an eine Zellkultur adaptieren muß, damit eine Virusreplikation erfolgen kann. Andererseits ist das Knochenmark nach Fischer et al. (1991b) einer der Orte der frühesten Virusreplikation, so daß hier durchaus Virus nachgewiesen werden kann, wenn andere Organe noch negativ sind.

Mit unserer RT-PCR erreichten wir ein Detektionslimit von 10^4 KID₅₀, was auch der bei Liu et al. (1991) und Wirz et al. (1993) beschriebenen Sensitivität für Schweinepest-PCR entspricht. Nur Proben, die von vornherein viel Virus enthalten, sind somit ohne vorherige Anzüchtung in der RT-PCR detektierbar. Das erklärt die Reihe Ag-positiver Proben, die in der PCR negativ blieben, da wir möglichst die Organanreicherung bzw. die Anzüchtung für die PCR genutzt haben. Ziel war es zu überprüfen, ob auf diesem Wege eventuell schneller Ergebnisse zu erhalten sind bzw. ob nicht mehr vermehrungsfähiges Virusmaterial in den Ausgangsproben vorhanden ist. Das erste Ziel kann nur bei bestimmten, sehr virushaltigen Proben erreicht werden, und über das letztere kann noch keine Aussage getroffen werden, da der untersuchte Probenumfang zu gering war.

Bei den von uns untersuchten Wildschweinen wurden beide Methoden des Antikörpernachweises (ELISA, IIFT) nur dann durchgeführt, wenn entweder das Ergebnis im ELISA fraglich oder KSPV bei dem entsprechenden Tier nachgewiesen worden war. Bei letzteren zeigte sich, daß die Ergebnisse beider Methoden nicht immer übereinstimmten. Vier der nicht übereinstimmenden Proben reagierten im ELISA negativ und im IIFT positiv (vgl. Tabellen 31 und 33), bei drei Proben war es genau umgekehrt (vgl. Tabellen 31 und 39). Für im ELISA fragliche Proben war das Ergebnis des IIFT maßgebend. Für alle übrigen Proben galt das Ergebnis des ELISA.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Auswertung eines wissenschaftlichen Feldversuches zur oralen Immunisierung (o.I.) von Wildschweinen gegen Klassische Schweinepest (KSP) in Mecklenburg-Vorpommern. Das Immunisierungsgebiet wurde hierbei als Impfgürtel um das gefährdete Gebiet angelegt, wobei in bestimmten Bereichen in das infizierte Gebiet hinein immunisiert wurde. Teile der drei Landkreise Güstrow, Müritz und Ostvorpommern (OVP) mit jeweils verschiedenem Ausgangsstatus bezüglich der Verseuchung mit KSPV wurden hierbei näher untersucht. Gegenstand der Betrachtungen sind die ersten vier Immunisierungen, welche jeweils im Abstand von etwa einem halben Jahr erfolgten.

Es wurden der Antikörperstatus von im Immunisierungsgebiet gestreckten Wildschweinen bestimmt sowie spezielle Organe auf das Vorhandensein von KSPV eingehend untersucht. Weiterhin wurde in ausgewählten Knochen des gestreckten Schwarzwildes der Nachweis von Oxytetracyclin (OTC) geführt, welches dem Köder als Markersubstanz beigegeben war.

Nach einem vielversprechenden Beginn der o.I. mit Antikörperprävalenzen von 35,5% in der 1. Immunisierungsperiode (IP) bzw. 42,1% in der 2. IP kam es zu einem Rückgang der Antikörperbefunde auf zunächst 37,5% in der 3. IP und schließlich 27,1% in der 4. IP, dessen Ursachen diskutiert werden. Bei den Alttieren war der Anteil serologisch positiver Wildschweine ab der 2. IP relativ stabil. Er lag insgesamt zwischen 50 und 70%, wobei sich die in der 2. IP noch weit auseinander liegenden Werte von 33,3% adulter Antikörperträger im Landkreis (LK) Müritz und 88,9% derselben im LK Güstrow bis zur 4. IP hin allmählich angleichen. Nach den ersten vier IP waren von den Alttieren des LK Güstrow 72,7%, des LK Müritz 60% und des LK OVP 57,1% serologisch positiv. Bei den Überläufern wurden in der 2. und 3. IP Antikörperprävalenzen von ca. 50% gefunden, während sie in der 4. IP nur noch knapp 30% betrug. Dieser Rückgang ist durch die schlechten Ergebnisse der o.I. im LK OVP mit nur ca. 18% serologisch positiven Überläufern verschuldet. Die größten Schwankungen sind bei den Frischlingen zu verzeichnen, die in der 1. und 3. IP Antikörperprävalenzen von ca. 40% aufwiesen (Ausnahme 3. IP in OVP mit nur 12%). Dagegen beeinträchtigen bei denen zum Zeitpunkt der Impfköderaushagen im Frühjahr noch neugeborenen Frischlingen eine Reihe von Faktoren die aktive Immunisierung, so daß in der 2. und 4. IP nur 3 bis 4% serologisch positiv waren.

Trotz der rückläufigen Tendenz bei den Antikörperergebnissen gegen Ende der ersten vier Immunisierungsperioden konnte aber das Ziel, die Ausbreitung der KSP über den Immunisierungsgürtel hinaus zu verhindern, erreicht werden.

Virusfunde traten während der o.I. in allen drei Landkreisen auf, doch nach der 4. Immunisierung waren die Landkreise Müritz und OVP virusfrei. Die Virusinzidenzen lagen über alle vier IP für den LK Güstrow bei 4,2%, für den LK Müritz bei 2,8% und für den LK OVP bei 1,3%. Insgesamt 64% der virologisch positiven Wildschweine waren Frischlinge. Die Anwendung des Markers OTC konnte in diesem Feldversuch nicht überzeugen und liefert nur einen gewissen Anhaltspunkt über Aussagen zur Herkunft der gefundenen Antikörper.

Die o.I. wird als ein geeignetes Verfahren zur Erhöhung des Immunstatus im Bestand und zur Minderung des Infektionsdruckes im Rahmen der Bekämpfung der KSP beim Schwarzwild eingeschätzt. Sie ist allerdings mit hohem logistischen Aufwand verbunden und einer Reihe von Einflußfaktoren unterworfen, welche nicht immer ausgeschaltet werden können. Wesentlich ist, daß die o.I. nur zusammen mit einer verstärkten Bejagung der Wildschweine, vor allem der Frischlinge, effektiv ist. Vor allem in Gebieten mit sehr hoher Schwarzwildichte ist ansonsten keine Verminderung des Infektionsdruckes und schnelle Beendigung des Seuchengeschehens zu erwarten.

Als Ergänzung zum Feldversuch der o.I. wurden drei tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt, welche der Beantwortung von aufgetretenen Fragen zur Wirksamkeit der Immunisierung dienen sollten. Diese wurden an Hausschweinen durchgeführt.

Ein Versuch beschäftigte sich mit der frühestmöglichen Feststellung des Auftretens von Antikörpern im Blut immunisierter Hausschweine bei gleichzeitiger Überprüfung der Impfvirusausscheidung. Ein Nachweis von KSPV-spezifischen Antikörpern ist danach frühestens in der 2. Woche nach o.I. zu erwarten, wobei alle Tiere erst gegen Ende der 3. Woche eindeutig positiv waren. Impfvirus wurde nur bei einem Tier am 7. d p.v. gefunden.

In einem weiteren Versuch wurde die o.I. gleichzeitig mit einer intranasalen Infektion mit hochvirulentem KSPV in geringer Dosis durchgeführt. Während es bei einigen Hausschweinen zu einem mildereren Verlauf der Schweinepest gegenüber der Kontrollgruppe kam, reagierten andere bei gleichzeitiger o.I. und Infektion wesentlich heftiger, erkrankten und verendeten früher als die Schweine der Kontrollgruppe.

Im dritten Versuch kam ein schwachvirulentes Schweinepestvirusisolat aus unserem Immunisierungsgebiet zum Einsatz, welches ebenfalls zeitgleich mit dem oralen Impfstoff

appliziert wurde. Bei den vakziniert-infizierten Hausschweinen der Versuchsgruppe traten lediglich kurzzeitig sehr milde, unspezifische klinische Symptome auf, während bei denen der Infektionskontrollgruppe neben abgemilderten respiratorischen und gastrointestinalen Symptomen bei zwei Tieren auch ein tödlicher Krankheitsverlauf mit bakteriellen Komplikationen zu verzeichnen war.

Diese Laboruntersuchungen lieferten wertvolle Hinweise über bestimmte Abläufe, die bei oraler Immunisierung in einem infizierten Gebiet auftreten können bzw. zur erfolgreichen Seuchenbekämpfung beachtet werden müssen. Eine weitreichende Virusdiagnostik ist im Zusammenhang mit Immunisierungsmaßnahmen unbedingt erforderlich.

7. Summary

Oral immunization of wild boar against classical swine fever in Mecklenburg – Western Pomerania

The current thesis deals with field studies on oral immunization of wild boar against classical swine fever (CSF) in Mecklenburg-Western Pomerania. The immunization zone was arranged as a cordon sanitaire around the defined infected area. In some regions immunization was done within infected areas as well. Parts of the three districts Güstrow, Müritz and Ostvorpommern with different status in the antigen incidence and antibody prevalence of the wild boar population were included in the studies. The evaluation of four immunization periods is the subject of this thesis. Immunizations were carried out every six months.

Wild boar shot in the immunization cordon were investigated on their antibody response and some special organs were surveyed for virus of CSF thoroughly. Additionally different bones were examined for oxytetracycline (OTC), a marker contained in the bait matrix.

After a very promising start with antibody prevalences of 35.5% in the first and 42.1% in the second immunization period (i.p.) we had to report a drop in antibody responses to 37.5% in the third and finally 27.1% in the fourth i.p.. The reasons of this development are discussed. From the second to the fourth i.p. the proportion of serological positive animals among adults was about 50 to 70%. Young wild boars showed antibody prevalences of about 50% in the second and third, but only about 30% in the fourth i.p. This drop is due to the bad results of only 18% serological positive young wild boars in Ostvorpommern. The fluctuations between the immunization periods were most conspicuous among the piglets. In the first and third i.p. the antibody prevalences were about 40%, but in the third i.p. only 12% in Ostvorpommern. At the time of the second and fourth i.p. in early spring some factors reduce the value of an active immunization in newborn piglets, for which reason only 3 to 4% of the piglets were serologically positive. Nevertheless we reached the main aim of the immunization, which was to prevent the spread of CSF beyond the cordon.

In every district we found virus of CSF during the immunization periods. The districts Müritz and Ostvorpommern were free of virus after the fourth immunization. The virus incidences were 4.2% in Güstrow, 2.8% in Müritz and 1.3% in Ostvorpommern. The main proportion of the virologically positive animals were represented by the piglets with 64%.

We are not convinced of the usefulness of the OTC marker in these studies. It gives only little indication on the origin of antibodies.

We regard oral immunization as a suitable method to improve the herd immunity and reduce risk of infection with CSF in wild boar. It needs a high logistic expenditure and is influenced by several factors. It is not possible to eliminate all of them. Both oral immunization and increased hunting of wild boar result in a reduced incidence of CSF. The intention is to eliminate the CSF epizootic faster this way.

In addition to the field studies of oral immunization we carried out three animal experiments with domestic pigs to answer some of our questions on effectiveness of immunization.

One experiment was about the first appearance of antibodies after oral immunization of domestic pigs against CSF and to detect the transmission or persistence of vaccine virus. A slight detection of antibodies was possible not before the second week, but clearly positive results were visible as late as 3 weeks after o.i. Vaccine virus could be found on day 7 p.v. in one piglet.

In another one oral immunization and infection with a low dose of high virulent CSFV were carried out simultaneously. In vaccinated – infected domestic piglets we found both milder and more serious course of the disease with a faster deadly outcome than in piglets of the infection group.

In the last experiment we used a low virulent CSFV isolate from the immunization area for simultaneous application with oral vaccine. In vaccinated – infected piglets clinical symptoms were very mild and short lasting, whereas two piglets of the infection group suffered from mild respiratory and gastrointestinal symptoms and one piglet died of CSF with bacterial complications.

These investigations gave important clues on influences on oral immunization in a CSFV-infected population and on successful disease control. Thorough virus diagnostics is absolutely necessary in immunization areas.

8. Literaturverzeichnis

Baker, J. (1946): Serial passage of hog cholera virus in rabbits. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 63, 183-187

Baer, G., J. Shaddock, A. Hayes and P. Savarie (1985): Iophenoxic acid as a serum marker in carnivores. J. Wildl. Manage. 49 (1), 49-51

Beer, J., W. Wittmann, E. Lehnert, S. Tesmer, M. Glaner, V. Kaden und E. Karge (1978): Die Immunprophylaxe und -metaphylaxe gegen Schweinepest in der Deutschen Demokratischen Republik mit Schweinepest-Lebendvirusvakzine „Riems“. Mh.Vet.-Med. 33, 543-548

Brendel, Ch. (1998): Zwei Seiten einer Medaille. Ablenkfütterungen und Korrungen unter dem Blickwinkel Hegegemeinschaft. unsere Jagd 2, 8-11

Caij, A., G. Muyldermans, A. De Smet, R. Hamers and F. Koenen (1993): Production and characterization of monoclonal antibodies against hog cholera virus (Alfort 187 strain). Arch. Virol. 131, 185-192

Canal, C. W., I. Hotzel, L. Lopes de Almeida, P. M. Roehe and A. Masuda (1996): Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Vet. Microbiol. 48, 373-379

Carbrey, E. A., W. C. Stewart and S. H. Young (1966): The changing picture of hog cholera. Case studies. J. Am. Vet. Med. Ass. 149, 1720-1724

Carbrey, E. A., W. C. Stewart, J. L. Kresse and M. L. Snyder (1977): Inapparent hog cholera infection following the inoculation of field isolates. CEC Semin. on Hog Cholera / Classical Swine Fever and African Swine Fever, Hannover, EUR 5904, 214

Chenut, G., A.-F. Saintilan, C. Burger, F. Rosenthal, C. Crucière, M. Picard, V. Bruyère and E. Albina (1999): Oral immunisation of swine with a classical swine fever vaccine (Chinese strain) and transmission in rabbits and sheep. Vet. Microbiol. 64, 265-276

Cheville, N. F. and W. L. Mengeling (1969): The pathogenesis of chronic hog cholera (swine fever). Histologic, immunofluorescent and electron microscopic studies. *Laboratory Investigation* 20, 261-274

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159

Colijn, E. O., M. Bloemraad and G. Wensvoort (1997): An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 59, 15-25

Collett, M. S., R. Larson, S. Belzer and E. Retzel (1988a): Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genom organization of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208

Collett, M. S., M. A. Wiskerchen, E. Welniak and S. Belzer (1991): Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch. Virol.* 3, 19-27

Collett, M. S., R. Larson, C. Gold, D. Strick, D. K. Anderson and A. F. Purchio (1988b): Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191-199

Dämmrich, K. (1969): Die Eigenfluoreszenz der Tetracycline und ihre Anwendung bei der Untersuchung des Skeletts. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 16, 309-311

Dahle, J. and B. Liess (1995): Assessment of safety and protective value of a cell culture modified strain „C“ vaccine of hog cholera / classical swine fever virus. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 108, 20-25

Dahle, J., B. Liess, V. Moennig und C. O. Z. Coulibaly (1991): Anwendung monoklonaler Antikörper zur Differentialdiagnose von Pestivirusinfektionen beim Schwein. *Tierärztl. Praxis* 19, 151-155

Dahle, J., G. Schagemann, V. Moennig and B. Liess (1993): Clinical, virological and serological findings after intranasal inoculation of pigs with bovine viral diarrhoea virus and subsequent intranasal challenge with hog cholera virus. *J. Vet. Med. B* 40, 46-54

Darbyshire, J. H. (1960): A serological relationship between swine fever and mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 72, 331

Dedek, J., H. Loepelmann, F. Loepelmann, L. Kühne und M. Rex (1991): Praxisbericht über den Nachweis von OTC in Knochenstäben von Wildtieren mittels Fluoreszenzmikroskopie. *Mh. Vet. Med.* 46, 8-10

Depner, K., A. Gruber and B. Liess (1994): Experimental infection of weaner pigs with a field isolate of hog cholera / classical swine fever virus derived from a recent outbreak in Lower Saxony. I: Clinical, virological and serological findings. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 81, 370-373

Depner, K., V. Moennig und B. Liess (1996): Epidemiologische Betrachtungen zur „typischen“ und „atypischen“ Schweinepest. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* 3. Jahrgang IV, 335-342

Depner, K., V. Moennig und B. Liess (1997): Aktuelle Fragen zur klassischen Schweinepest beim Wildschwein. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* 4. Jahrgang I, 44-47

Depner, K., B. Kern und B. Liess (1998): Epidemiologische Relevanz der Persistenz von KSP-Virus beim Schwarzwild (*Sus scrofa* sp.). *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* 5. Jahrgang III, 244-248

Depner, K., A. Müller, A. Gruber, A. Rodriguez, K. Bickhardt and B. Liess (1995): Classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa*) - experimental infections and viral persistence. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 102, 381-384

Diderholm, H. and Z. Dinter (1966): Infectious RNA derived from bovine virus diarrhoea virus. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 201, 270-272

Dunne, H. W. (1975): Hog cholera (European swine fever). In: Dunne, H. W. and A. D. Leman (eds.): Diseases of swine. 4th ed., Iowa State Univ. Press, 222-239

Ebrecht, A. (1977): Die Problematik des biologischen Hemmstoffnachweises in Schlachtkörpern. Inaugural-Dissertation, Universität Göttingen, Landwirtschaftl. Fakultät

Edwards, S., V. Moennig and G. Wensvoort (1991): The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 29, 101-108

Fiedler, J. (1997): Die epidemiologische Situation der Schweinepest bei Hausschweinen in Deutschland und die Beziehungen zu Schwarzwild. 2. Riemser Meeting zur oralen Immunisierung gegen KSP, Insel Riems, 25. - 26. Juni 1997, 4-8

Fischer, U. (1992): Vergleichende morphologische und immunmorphologische Untersuchungen zur Pathogenese der Schweinepest bei Infektionen mit hoch-, schwach- und avirulenten Virusstämmen. Dissertation A, Universität Leipzig, Vet.-Med. Fakultät

Fischer, U., V. Kaden und M. Glaner (1991a): Nachweis von Oxytetracyclin in Knochen nach oraler Immunisierung gegen Klassische Schweinepest. 4. Riemser Wissenschaftl. Symp., 16.-18. Oktober 1991, Greifswald, Kurzreferate, 52

Fischer, U., V. Kaden und J. Beyer (1991b): Zur Nachweissicherheit von Schweinepestvirusantigenen und zur Differenzierung der Feld- und Vakzinevirusinfektion mit dem direkten Immunfluoreszenztest an Organmaterial. *Mh. Vet.-Med.* 46, 133-136

Follmann, E., P. Savarie, D. Ritter and G. Baer (1987): Plasma marking of arctic foxes with iophenoxic acid. *J. Wildl. Dis.* 23 (4), 709-712

Fritzemeier, J., I. Greiser-Wilke, K. Depner, L. Haas und V. Moennig (1997): Klassische Schweinepest: Ergebnisse spezieller virologisch-epidemiologischer Untersuchungen. Tagung der Fachgruppen „Tierseuchen“ und „Virologie“, Gießen 5.-6. Juni 1997, 39-44

Gemmer, H., H. Seeger und W. Schale (1973): Beurteilung von Tetracyclin-Rückständen in Knochen von Wildschweinen. *Fleischwirtschaft* 53, 1598-1599

Glaner, M., V. Kaden, S. Tesmer and H. Hahnefeld (1984): The vaccine against Porcine Cholera („Riemsers Schweinepest-Vakzine“) - a cell culture vaccine of a high immunobiological valency. *Medicamentum*, Berlin/GDR 1984, Veterinary edition, 21-25

Grabbe, F. (1980): Untersuchungen zur Tetracyclineinfach- und Tetracyclindoppelmarkierung bei metabolischen endokrinen Osteopathien. Dissertation, Universität Hamburg, Fachber. Med.

Greiser-Wilke, I., V. Moennig, C. O. Z. Coulibaly, J. Dahle, L. Leder and B. Liess (1990): Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein. *Arch. Virol.* 111, 213-225

Gruber, A., K. Depner and B. Liess (1995): Experimental infection of weaner pigs with a field isolate of hog cholera / classical swine fever virus derived from a recent outbreak in Lower Saxony. II: Pathological findings. *Wien Tierärztl. Mschr.* 82, 179-184

Gutmann, B. (1987): Begleitende Laboratoriumsuntersuchungen des Feldversuches zur oralen Immunisierung bei Füchsen gegen Tollwut in Hessen vom Frühjahr 1983 bis Herbst 1984. Inaugural-Dissertation, J.-Liebig-Universität Gießen, Vet.-Med. Fakultät

Hanson, R. P. (1957): Origin of hog cholera. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 131, 211-218

Harding, M., C. Lutze-Wallace, I. Prud'homme, X. Zhong and J. Rola (1994): Reverse transcriptase-PCR assay for detection of hog cholera virus. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2600-2602

Hess, R. G., C. O. Z. Coulibaly, I. Greiser-Wilke, V. Moennig and B. Liess (1988): Identification of hog cholera viral isolates by use of monoclonal antibodies to pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 16, 315-321

Hesse, U. (1985): Der Nachweis von Tetracyclin und Oxytetracyclin aus Knochen mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) - Ein Beitrag zur Auswertung des Feldversuchs „Orale Immunisierung des Fuchses gegen Tollwut“ in Niedersachsen. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Hillmann, K. H. und V. Kaden (1994): Schluckimpfung gegen Wildschweinepest. Arbeitstagung des Bundesverbandes der beamteten Tierärzte, Fulda 28./29. April 1994, 207-215

Hillmann, K. H. und V. Kaden (1995): Schluckimpfung gegen Wildschweinepest. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Tagung der Fachgruppe „Tierseuchen“, Gießen, 7./8. Juni 1995, 29-33

Holm Jensen, M. (1981): Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. *Acta Vet. Scand.* 22, 85-98

Horzinek, M. (1973): The structure of togaviruses. *Prog. Med. Virol.* 16: 109-156

Hube (1998): Notwendige Schwarzwildbejagung unter dem Druck der Schweinepestbekämpfung in Mecklenburg-Vorpommern. *Weidwerk in Mecklenburg-Vorpommern* 7, 9-10

Kämmerer, H. (1965): Die Markierung des Knochenstoffwechsels durch Antibiotika der Tetracyclingruppe. *Med. Habil.-Schrift, Universität Göttingen*

Kaden, V. (1993): Orale Immunisierung gegen Klassische Schweinepest - eine Möglichkeit zur Bekämpfung der Krankheit beim Schwarzwild in besonderer Seuchensituation. Vortrag, Insel Riems, 22. September 1993

Kaden, V. (1994): Oral immunization of wild boar against swine fever in district of Soltau-Fallingb. First results of a field study. Report on Meeting of the National Swine Fever Laboratories, Brüssel, 24.-25. November 1994, 35-38

Kaden, V. (1995): Möglichkeiten und Grenzen der ESP-Bekämpfung bei Wildschweinen unter besonderer Berücksichtigung der Impfung. Jahrestagung Fachgruppe Schweinekrankheiten. Epikrisis der Bekämpfung der ESP, PRRS und AK. Hannover 16.-17. Februar 1995, 17-19

Kaden, V. (1996): Versuch der oralen Immunisierung gegen Klassische Schweinepest. Symposium zur Ökologie des Schwarzwildes, Mainz, 15.-16. April 1996. Schriften des Arbeitskreises Wildbiologie an der J.-Liebig-Univ. Gießen e.V., Heft 23, 209-217

Kaden, V. (1998a): Klassische Schweinepest bei Wildschweinen. Vorkommen in Europa - Möglichkeiten der Seuchenverbreitung in der Schwarzwildpopulation. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 5. Jahrgang I, 62-67

Kaden, V. (1998b): Zur Situation der Klassischen Schweinepest beim Schwarzwild in der Europäischen Gemeinschaft und zu einigen Aspekten der Seuchenverbreitung. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 111, 201-207

Kaden, V. und M. Glaner (1982): Zum Eintritt und zur Dauer der Immunität gegen Schweinepest nach aerogener Immunisierung. Arch. exper. Vet.med. 36, 593-599

Kaden, V. und E. Lange (1997): Bekämpfungskonzeption der Wild-Schweinepest. Tagung der Fachgruppen „Tierseuchen“ und „Virologie“, Gießen, 5.-6. Juni 1997, 20-31

Kaden, V. und E. Lange (1998): Vaccination as strategy of CSF control in wild boar. Meeting on Measures to control CSF in European wild boar, Perugia, 5.-7. April 1998, 110-114

Kaden, V., P. Heller, U. Polster und M. Glaner (1985): Eintritt und Dauer der Immunität nach aerogener Immunisierung von Schweinen gegen Schweinepest und Rotlauf. Arch. exper. Vet.med. 39, 730-737

Kaden, V., U. Fischer, U. Schwanbeck und R. Riebe (1992): Ist die Verfütterung von Grünsilage in Gebieten mit Schweinepest beim Schwarzwild eine Gefahr für die Hausschweinebestände? Experimentelle Studie. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 105, 73-77

Kaden, V., E. Lange, U. Schurig und G. Strebelow (1997): Problematik der Diagnostik von schwachvirulentem KSP-Virus – Experimentelle Studie. DVG, Jahrestagung der FG Schweinekrankheiten. Hannover, 20.-21. Februar 1997, 22-28

Kaden, V., P. Hübert, G. Strebelow, E. Lange, H. Steyer und P. Steinhagen (1999): Vergleich labordiagnostischer Methoden zum Nachweis einer Infektion mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) in der frühen Infektionsphase: Experimentelle Studie. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112, 52-57

Kamijo, J., S. I. Ohkuma, M. Shimuzu and Y. Shimuzu (1977): Differences in pathogenicity and antigenicity among hog cholera virus strains. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 17, 133-140

Kern, B. (1998): Experiences with CSF-vaccination of wild boar in Brandenburg. Meeting on Measures to control CSF in European wild boar, Perugia, 5.-7. April 1998, 122-127

Kiupel, H., J. Dedek und R. Kranz (1995): ESP-Situation in Mecklenburg-Vorpommern im Wildschweinepest-gefährdeten Bezirk und im Impfcordon vor sowie seit Beginn der Immunisierungsmaßnahmen. Meeting „Orale Immunisierung von Schwarzwild gegen Europäische Schweinepest (ESP)“, BFAV Insel Riems, 22. November 1995

Knowlton, F., P. Savarie, C. Wahlgren and D. Hayes (1987): Retention of physiological marks by coyotes ingesting baits containing iophenoxic acid, mirex, and rhodamine B. Vertebrate pest control and management materials: 5th volume, ASTM STP 974, S.A. Shumake and R.W. Bullard, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1987, 141-147

Kolomitsev, A., I. Vishnyakov, V. Zhesterev, E. Khripunov, V. Dubrovin, I. Khukhorov, N. Isakova, S. Tcheryatnickov, V. Fertickov, A. Yegorov, A. Semenikhine and Z. Pejsak (1998): Vaccination against classical swine fever in wild boar in Russia. Meeting on Measures to control CSF in European wild boar, Perugia, 5.-7. April 1998, 128-134

Kosmidou, A. (1995): Differenzierung und Charakterisierung von Isolaten und Mutanten des Schweinepestvirus mittels monoklonaler Antikörper. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Kosmidou, A., R. Ahl, H. J. Thiel and E. Weiland (1995): Differentiation of classical swine fever virus (CSFV) strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins. *Veterinary Microbiology* 47, 111-118

Koprowski, H., T. R. James and H. R. Cox (1946): Propagation of hog cholera virus in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 63, 178

Koprowski, H., T. R. James and H. R. Cox (1951): Laboratory studies and data on modified live hog cholera vaccine. *Proc. U. S. Livestock San. Assoc. 55th Ann. Meet.*, 214-223

Kraft, W., U. M. Dürr, M. Füll, H. Bostedt und K. Heinritzi (1997): Hämatologie. In: Kraft, W. und U. M. Dürr (eds.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, New York, 1997, 43-77

Krassnig, R., W. Schuller, J. Heinrich, F. Werfring, P. Kalas und M. Fruhwirth (1995): Isolierung des Erregers der Europäischen Schweinepest (ESP) aus importiertem gefrorenem Wildschweinfleisch. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 102, 56

Lai, S. S. and W. C. Ho (1989): Application of monoclonal antibody on dot immunoassay for the detection of hog cholera viral antigens and antibodies. *J. Chinese Vet. Sci.* 15, 19-25

Larson, G., P. Savarie and I. Okuno (1981): Iophenoxic acid and mirex for marking wild, bait-consuming animals. *J. Wildl. Manage.* 45 (4), 1073-1077

Leforban, Y., P. Vannier and R. Cariolet (1992): Protection of piglets born from ruminant pestivirus experimentally infected sows, and their contacts, to the challenge with hog cholera virus. *Ann. Rech. Vet.* 23, 73-82

Letz, W. (1997): Entwicklung und Verlauf des KSP-Geschehens im Land Brandenburg. 2. Riemser Meeting zur oralen Immunisierung gegen KSP, Insel Riems, 25.-26. Juni 1997, 13-15

Liess, B. (1987): Pathogenesis and epidemiology of hog cholera. *Ann. Rech. Vet.* 18, 139-145

Liess, B. and D. Prager (1976): The fluorescent neutralization test. In: Manual of standards for diagnostics and vaccines. Office International des Epizooties, Paris, 1992, 113-114

Liess, B., H.-R. Frey, S. M. Hafez and B. Roeder (1975): The course of natural swine fever virus infection in individual swine and investigations on the development of inapparent swine fever infections. In: Van Bakkum, J. G. (ed.): Diagnosis and epizootiology of classical swine fever. CEE-Publ. EUR 5486, Luxembourg, 99-113

Liu, S. T., S. N. Li, D. C. Wang, S. F. Chang, S. C. Chiang, W. C. Ho, Y. S. Chang and S. S. Lai (1991): Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. J. Virol. Meth. 35, 227-236

Loepelmann, H. (1994): Impfstoffe. In: Dedek, J. und T. Steineck (eds.): Wildhygiene. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 1994

Loepelmann, H. und J. Dedek (1987): Erfahrungen bei der Bekämpfung der Schweinepest beim Schwarzwild in einem Beobachtungsgebiet der DDR. Mh. Vet.-Med. 42, 313-316

Loepelmann, H. und J. Dedek (1991): Orientierende Untersuchungen zur oralen Immunisierung freilebenden Schwarzwildes. Tierärztl. Umschau 46, 775-778

Löscher, W., F. R. Ungemach, R. Kroker (1991): Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1991

Manz, D. (1976): Experimentelle und praktische Untersuchungen zur Markierung des Rotfuchses (*Vulpes vulpes* L.) als Vorbedingung zur Beantwortung nach seiner Erreichbarkeit über Köder für staatliche Tierseuchenbekämpfungs-Maßnahmen., Habil.-Schrift, J.-Liebig-Universität Gießen

Mayr, A., G. Eißner und B. Mayr-Bibrack (1984): Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1984

Mayr, A., P. A. Bachmann, B. Bibrack und G. Wittmann (1974): Virologische Arbeitsmethoden, Band I. Zellkulturen - Bebrütete Hühnereier - Versuchstiere. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1974

Mengeling, W. L. and N. F. Cheville (1968): Host response to persistent infection with hog cholera virus. Proc. Ann. Meet. US Anim. Health Assoc. 72, 283-295

Mengeling, W. L. and R. A. Packer (1969): Pathogenesis of chronic hog cholera: host response. Am. J. Vet. Res. 30, 409-417

Mengeling, W. L., E. C. Pirtle and J. P. Torrey (1963a): Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence. Application as a diagnostic and assay method. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 249-252

Mengeling, W. L., D. E. Gutekunst, A. L. Fernelius and E. C. Pirtle (1963b): Demonstration of an antigenic relationship between hog cholera and bovine viral diarrhea viruses by immunofluorescence. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 162-164

Meyer, H., B. Liess, H.-R. Frey, W. Hermanns and G. Trautwein (1981): Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. IV. Virological and serological studies in new-born piglets. Zbl. Vet. Med. B 28, 659-668

Meyers, G., T. Rümepf and H. J. Thiel (1989): Molecular cloning and nucleotide sequence of the genom of hog cholera virus. Virology 171, 555-567

Meynhardt, H. (1982): Schwarzwildreport. Mein Leben unter Wildschweinen. Neumann Verlag Leipzig, Radebeul, 1982

Milch, R. A., D. P. Rall and J. E. Tobie (1957): Bone localization of the tetracyclines. J. Nat. Cancer Inst. 19, 87-93

Moormann, R. J. M., P. A. M. Warmerdam, B. Van der Meer, W. M. M. Schaaper, G. Wensvoort and M. M. Hulst (1990): Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* 177, 184-198

Moennig, V., G. Schagemann, J. Dahle, I. Greiser-Wilke and L. Leder (1990): A new approach for the diagnosis of hog cholera. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 97, 91-93

Moennig, V. and P. G. W. Plagemann (1992): The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 41, 53-98

Moser, C., N. Ruggli, J. D. Tratschin and M. A. Hofmann (1996): Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. *Vet. Microbiol.* 51, 41-53

Mutschler, E. (1996): *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996

Muyldermans, G., A. Caij, A. De Smet, F. Koenen and R. Hamers (1993): Characterization of structural and non-structural proteins of hog cholera virus by means of monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 131, 405-417

Müller, A., K. Depner and B. Liess (1996): Evaluation of a gp 55 (E2) recombinant-based ELISA for the detection of antibodies induced by classical swine fever virus. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 103, 451-453

Narita, M., K. Kawashima and M. Shimizu (1996): Viral antigen and B and T Lymphocytes in lymphoid tissues of gnotobiotic piglets infected with hog cholera virus. *J. Comp. Path.* 114, 257-563

Paton, D. J., J. P. Lowings and A. D. T. Barret (1992): Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 190, 763-772

Pittler, H., M. Brack, L. C. Schulz, G. Rohde, K. Witte und B. Liess (1968): Untersuchungen über die Europäische Schweinepest. Dtsch. tierärztl. Wschr. 75, 537-542

Pittler, H., J. Fiedler, D. Jentsch, P. Hasselbach und M. Kramer (1995): Der Schweinepest-Seuchenzug 1993/94, Probleme und Konsequenzen. Tierärztl. Umschau 50, 522-530

Plateau, E., P. Vannier and J. P. Tillon (1980): Experimental study of a mild virulent strain of hog cholera: individual variations and horizontal transmission. Zbl. Vet. Med. B 27, 650-657

Pohlmeyer, K. (1998): Populationsdynamik und Raumnutzung bei Schwarzwild. 3. Schleswig-Holsteinische Seminarveranstaltung Tierseuchenbekämpfung, Ratzeburg, 8. September 1998

Ressang, A. A. and J. L. Den Boer (1968): A comparison between the cell culture, frozen tissue section, impression and mucosal smear techniques for fluorescent antibody in the diagnosis of hog cholera. Tijdschr. Diergeneesk. 93, 72-89

Rümenapf, T., G. Unger, R. Stark, J. H. Strauss and H. J. Thiel (1993): Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. J. Virol. 67, 3288-3294

Rutili, D., V. Guberti and G. Ferrari (1998): Classical swine fever in wild boar. Evaluation of control measures applied in Italy and proposal for the future. Meeting on Measures to control CSF in European wild boar, Perugia, 5.-7. April 1998, 135-139

Schlüter, H., M. Kramer und J. Teuffert (1997): Aktuelle Seuchensituation bei Haus- und Wildschweinen; Seuchendaten, ökonomische Fakten und Risikoeinschätzung. Tagung der Fachgruppen „Tierseuchen“ und „Virologie“, Gießen, 5.-6. Juni 1997, 7-19

Schütz, W. (1888): Die Schweinepest in Dänemark. Arch. Tierheilkd. 14, 376-383

Schuster, P. (1996): Untersuchungen zur Köderung des Schwarzwildes als Grundlage zur Applikation von Arzneimitteln und Impfstoffen. Dissertation, Universität Leipzig, Vet.-Med. Fakultät

Stahl, D. (1996): Zwanzig Jahre Lüneburger Modell – Erfahrungen und Ergebnisse. Symposium zur Ökologie des Schwarzwildes, Mainz, 15.-16. April 1996. Schriften des Arbeitskreises Wildbiologie an der J.-Liebig-Univ. Gießen e.V., Heft 23, 223-229

Stark, R., T. Rügenapf, G. Meyers and H. J. Thiel (1990): Genomic localization of hog cholera virus proteins. *Virology* 174, 286-289

Stark, R., G. Meyers, T. Rügenapf and H. J. Thiel (1993): Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* 67, 7088-7095

Stöhr, K., R. Gebauer, W. Herold, J. Hähn, W. Priefel und M. Kintscher (1990a): Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OTC in Knochen von Füchsen. *Mh. Vet.-Med.* 45, 88-92

Stöhr, K., E. Karge, F. Loepelmann, H. Loepelmann, R. Gebauer, J. Dedek und J. Hähn (1990b): Entwicklung des Impfköders für die orale Immunisierung freilebender Füchse gegen Tollwut. *Mh. Vet.-Med.* 45, 165

Strebelow, G. and V. Kaden (1998): Characterization of classical swine fever virus field isolates originating from wild boars and domestic pigs from federal states of Mecklenburg-Western Pomerania and Brandenburg. OIE Symposium on Classical Swine Fever (Hog Cholera). Birmingham (United Kingdom), 9-10 July 1998, Summaries, 50

Strebelow, G., U. Schurig, J. Dedek und V. Kaden (1996): Molekularbiologische Charakterisierung aktueller Schweinepestisolate vom Schwarzwild. 15. Arbeits- und Fortbildungstagung Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID), Staffelstein, 1.-2. Oktober 1996, Mitteilung II/1996, Anlage 27, 1-5

Šušá, M., M. König, A. Saalmüller, M. Reddehase and H. J. Thiel (1992): Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol.* 66, 1171-1175

Terpstra, C. (1977): The immunity against challenge with swine fever virus of piglets from sows vaccinated with C-strain virus. Tijdschr. Diergeneeskd. 102, 1293

Terpstra, C. and G. Wensvoort (1988): The protective value of vaccine-induced neutralising antibody titres in swine fever. Vet. Microbiol. 16, 123-128

Terpstra, C., R. Woortmeyer and S. J. Barteling (1990): Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain. Dtsch. tierärztl. Wschr. 97, 77-79

Tesmer, S., D. Urbaneck, V. Kaden, W. Wittmann und H. Hahnefeld (1973): Zur Wirkung von Schweinepest-Lebendvirusvakzine aus dem Impfvirusstamm „C“ bei tragenden Sauen und deren Nachzucht. Mh. Vet.-Med. 28, 251-254

Tesmer, S., P. Werner, M. Glaner, B. Lange und F. Gentner (1985): Impfstoffproduktion am Friedrich-Loeffler-Institut Insel Riems. Arch. exper. Vet.med. 39, 684-691

Teuffert, J., H. Schlüter und M. Kramer (1997): Europäische Schweinepest. Übersicht zur internationalen (Europa) und nationalen Schweinepestsituation - ermittelte Einschleppungsursachen und Verschleppungsrisiken. Dtsch. Tierärzteblatt 11, 1078-1080

Thiel, H. J., R. Stark, E. Weiland, T. Rümenapf and G. Meyers (1991): Hog cholera virus: Molecular composition of virions from a pestivirus. J. Virol. 65, 4705-4712

Trautwein, G. (1988): Pathology and pathogenesis of the disease. In: Liess, B. (ed.): Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht, NL, 27-54

Urbaneck, D. (1971): Stand der Entwicklung und des Einsatzes von Schweinepest-Impfstoffen. Mh. Vet.-Med. 26, 785-792

Urbaneck, D. (1987): Schweinepest. In: Beer, J. (ed.): Infektionskrankheiten der Haustiere, Teil 1., VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1987, 97-113

Urbanek, D., S. Tesmer, W. Wittmann und V. Kaden (1973): Zum Einsatz von Schweinepest-Lebendvirusvakzine aus dem lapinisierten Impfvirusstamm „C“ zur Schweinepestbekämpfung nach Seuchenausbruch. Mh. Vet.-Med. 28, 921-927

Valder, W.-A. (1997): Aktuelles Vorkommen der Klassischen Schweinepest im Ausland und Seuchenschutzmaßnahmen bei der Einfuhr. Tagung der Fachgruppen „Tierseuchen“ und „Virologie“, Gießen, 5.-6. Juni 1997, 32-38

Van der Molen, E. J. and J. T. van Oirschot (1981a): Congenital persistent swine fever (hog cholera) I. Pathomorphological lesions in lymphoid tissues, kidney and adrenal. Zbl. Vet. Med. B 28, 89-101

Van der Molen, E. J. and J. T. van Oirschot (1981b): Congenital persistent swine fever (hog cholera) II. Further pathomorphological observations with special emphasis on epithelial, vascular and nervous tissues. Zbl. Vet. Med. B 28, 190-204

Van Oirschot, J. T. (1979a): Experimental production of congenital persistent swine fever infections I. Clinical, pathological and virological observations: Vet. Microbiol. 4, 117-132

Van Oirschot, J. T. (1979b): Experimental production of congenital persistent swine fever infections II. Effect on functions of the immune system: Vet. Microbiol. 4, 133-147

Van Oirschot, J. T. (1992): Hog cholera. In: Leman, A. D., B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire and D. J. Taylor, (eds.): Diseases of swine. Wolfe Publishing Ltd. 7th Edition, 274-285

Van Oirschot, J. T. (1994): Hog cholera virus. In: Webster, G. and A. Granoff (eds.): Encyclopedia of Virology. Ac. Press, London, 1994

Vilček, Š, T. Stadejek, I. Takácsová, L. Strojný and M. Mojžiš (1997): Genetic analysis of classical swine fever virus isolates from a small geographic area. Dtsch. tierärztl. Wschr. 104, 9-12

Wegmann, S. (1996): Vorkommen von Tetracyclin- Rückständen in Knochen von Schlachtschweinen. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 48, Heft 8, 171-172

Weiland, E., R. Stark, B. Haas, T. Rümenapf and H. J. Thiel (1990): Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulphide-linked heterodimer. *J. Virol.* 64, 3563-3569

Weiland, E., R. Ahl, R. Stark, F. Weiland and H. J. Thiel (1992): A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* 66, 3677-3682

Wengler, G. (1991): Family Flaviviridae. In: Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson and F. Brown (eds.): Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Berlin: Springer Verlag, 223-233

Wensvoort, G. (1989a): Epitopes on structural proteins of hog cholera (swine fever) virus. PhD thesis, State University of Utrecht, The Netherlands.

Wensvoort, G. (1989b): Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 70, 2865-2876

Wensvoort, G., M. Bloemraad and C. Terpstra (1988): An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 17, 120-140

Wensvoort, G., E. P. de Kluyver, J. Boonstra and C. Terpstra (1989a): Production and characterization of monoclonal antibodies against the „Chinese“ strain of hog cholera vaccine virus. In: Epitopes on structural proteins of hog cholera „swine fever“ virus. Proefschrift, Faculteit der Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit, Utrecht, Nederland, 99-113

Wensvoort, G., C. Terpstra, E. P. de Kluyver, C. Kragten and J. C. Warnaar (1989b): Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet. Microbiol.* 21, 9-20

Wensvoort, G., C. Terpstra, J. Boonstra, M. Bloemraad and D. van Zaane (1986): Production of monoklonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* 12, 101-108

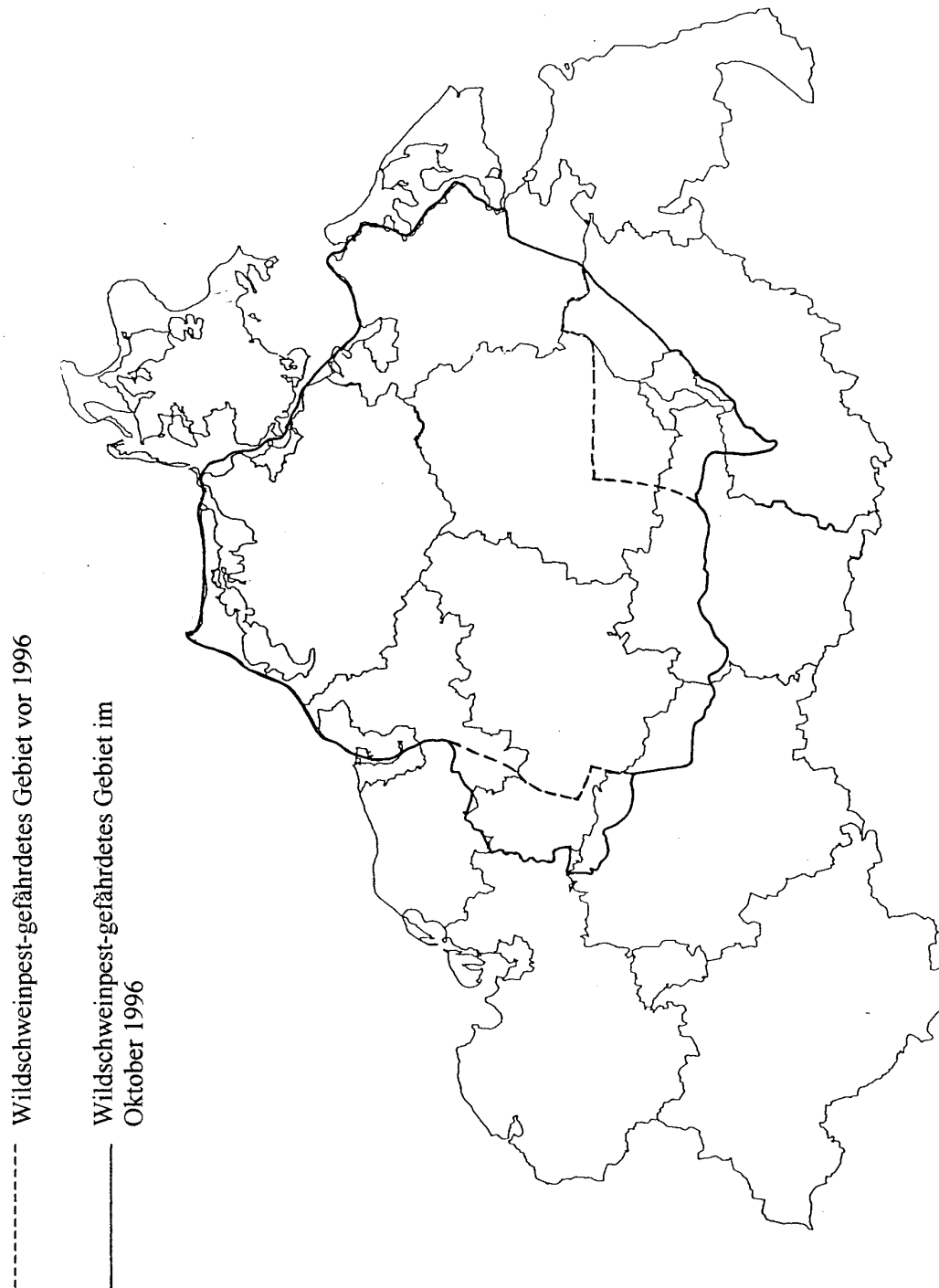
Westergaard, J. M. (1996): The situation of classical swine fever and African swine fever in the European Community. In: Commission of the European Communities: Report on Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories. Alghero, Sardinia, Italy, 3-5 June 1996

Wirz, B., J. D. Tratschin, H. K. Müller and D. B. Mitchell (1993): Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1148-1154

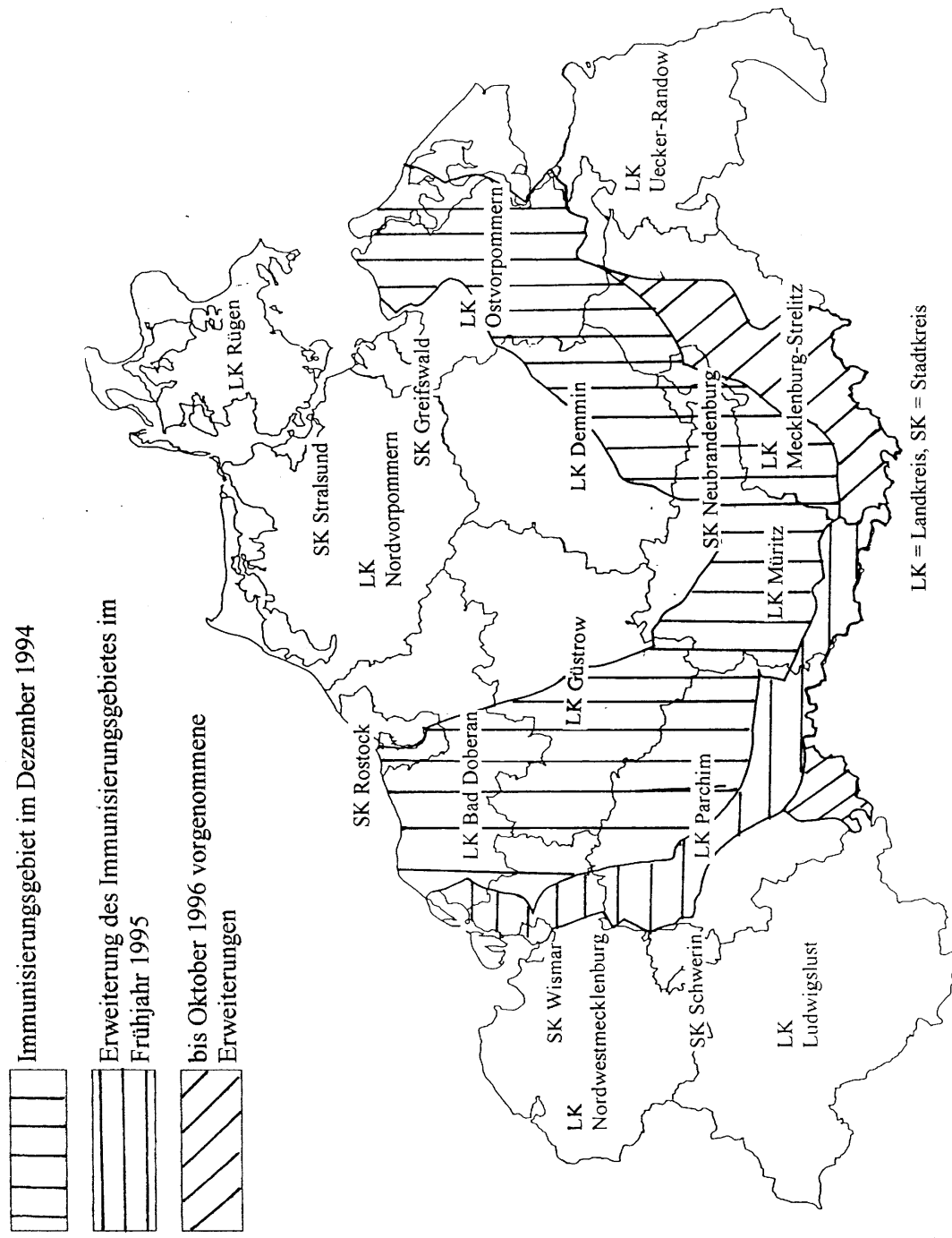
Wittmann, W., D. Urbaneck, S. Tesmer, H. Bergmann und J. Beyer (1972): Zur Immunitätsbildung beim Schwein nach Impfung mit Schweinepest-Lebendvirusvakzine „Riems“. *Mh. Vet.-Med.* 27, 601-606

Zhou, Y., V. Moennig, C. O. Z. Coulibaly, J. Dahle and B. Liess (1989): Differentiation of hog cholera and bovine virus diarrhoea viruses in pigs using monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. B* 36, 76-80

Wildschweinpest-gefährdetes Gebiet in Mecklenburg-Vorpommern – Darstellung der
Ausbreitungstendenz der KSP von 1993 bis 1996



Veränderungen der Lage des Immunisierungskorridors im Verlaufe der vier ersten oralen Immunisierungen gegen KSP beim Schwarzwild in Mecklenburg-Vorpommern



Auswertung der Köderaufnahme

Anlage 3

- Wer hat gekirrt? :
- Anzahl der angelegten Kirrungen :
- Wie lange wurde gekirrt? :
- 1. Beköderungsdatum :
- 2. Beköderungsdatum :
- Anzahl der beköderten Plätze :
- Zustand der Köder : tiefgefroren
 aufgetaut
- Anzahl der insgesamt ausgebrachten Köder :
- Wer hat die Köder ausgebracht? :
- Anzahl der ausgebrachten Köder/Platz :
- Größe der Plätze im Durchschnitt (m²) :
- Wurden die Köder eingearbeitet? : ja
 nein
- Anzahl der eingesammelten (nicht auf-
 genommenen) Köder insgesamt :
- . pro Köderplatz :
- . dav. unbeschädigt :
- (Blister nicht eröffnet) :

Hinweise und Anmerkungen

- Beobachtungen zur Aufnahme :
- Rottenstärke/Platz: :
- Köderkonkurrent beobachtet : nein ja Fuchs an Köderplätzen
 Dachs an Köderplätzen
 Marder an Köderplätzen
 Reh an Köderplätzen
 Rotwild an Köderplätzen
 Raben an Köderplätzen
 an Köderplätzen
- Wurden Bißspuren an den wiedergefundenen : ja
 Ködern festgestellt? : nein
 . Von welcher Tierart? :
- Wann erfolgten Nachkontrollen? :

Sonstiges

Anforderungen an die Entnahme und Behandlung von Blutproben des Schwarzwildes für serologische Untersuchungen im Rahmen des oralen Immunisierungsprogrammes

1. Die Entnahme der Blutprobe erfolgt sauber aus der Brusthöhle (Kammer). Ist dies nicht möglich, kann die Entnahme aus dem Herzen oder aus den Brandadern erfolgen.
2. Zur Blutentnahme wird das Blutröhrchen bis ca. 1 cm unter dem Stopfen mit Blut aus der Brusthöhle (s. 1.) gefüllt.
3. Das Röhrchen ist anschließend mit dem Stopfen zu verschließen und **zweimal zu schwenken**.
4. Nach der Probenentnahme sollte das Röhrchen **aufrecht und eine kurze Zeit ruhiggestellt** werden (Zweck: Förderung des Absatzprozesses des Blutes).
5. Auch während des Transportes zur Sammel- bzw. und Untersuchungsstelle sollte das Blut vor Schütteln und Wärmeeinwirkung bewahrt werden. Auf **keinen Fall darf das blutgefüllte Röhrchen eingefroren werden**.
6. Die in Zwischensammelstellen (Veterinärämter) angelieferten Proben sind bis zum Weitertransport an die Untersuchungsstelle kühl zu lagern, **nicht aber einzufrieren** (s. 5.).
7. Die Probe ist zu kennzeichnen und mit einem Begleitschreiben zu versehen. Für die schnellere Bearbeitung und Befundmitteilung ist unbedingt die **Sammelliste** zusätzlich auszufüllen und einzusenden.
8. Bei dem gestreckten Tier festgestellte oder vermutete Krankheitserscheinungen sind auf dem Probenbegleitschein zu vermerken, evtl. auch der Hinweis auf eine veränderte Situation im Einstandsgebiet.

Entnahme von Organproben für die virologische bzw. Markeruntersuchung

1. Zu entnehmende Organe

- Rachenmandel (Tonsille) - sehr wichtig!
 - Mandibular- oder Rachenlymphknoten
 - Darm- oder Kniefaltelymphknoten
- } mindestens 2 verschiedene Lymphknoten (Lymphdrüsen)
- Am leichtesten sind die Darmlymphknoten zu finden.
- Milz und Niere (ein Drittel des Organs)
 - Rippe [oder Brustbein] (etwa 5 cm langes Stück mit Knorpel, Verhältnis Knochen/Knorpel = etwa 4:1, besser ohne Knorpel als zu hoher Knorpelanteil !!!)
 - Mittelfußknochen (5 - 10 cm) mit Laufmuskel

2. Hinweise zu Organentnahme und Probenbehandlung

- Die Entnahme der Organproben muß sauber erfolgen.
- Die Organproben sind in die mitgelieferten Plastbehälter (-tüten) zu verbringen.
- Die Proben sind zu kennzeichnen (Proben-Nr.) und mit dem Begleitschreiben zu versehen.
- Während des Transportes zur Sammel- bzw. Untersuchungsstelle sind die Proben möglichst kühl zu lagern, zumindest aber nicht direkt dem Sonnenlicht auszusetzen.
- Die in Zwischenlagerstellen (Veterinärämter) angelieferten **Organproben** sind bis zum Weitertransport an die Untersuchungsstelle einzufrieren, wenn die Lagerung länger als 24 Stunden dauert. Der Weitertransport zur Untersuchungsstelle **hat** dann in gefrorenem Zustand zu erfolgen.
- Der Transport der Organproben erfolgt per Kurier. Die Proben können aber auch direkt an eine Untersuchungsstelle des LVL angeliefert werden.

Kreis:

Sammelstelle:

Anlage 5

PROBENBEGLEITSCHHEIN
Orales Immunisierungprogramm Schwarzwild (OIS)

OIS-Gebiet: ja / nein ****
Wildschweinepestgefährdetes Gebiet: ja / nein ****
Monitoringgebiet (MOG): ja / nein ****
Datum der ersten Köderauslage:

1. Erlegungsort (mit PLZ) :
2. Jagdbezirk/Teiljagdbezirk :
3. Forstamt/Revierförsterei * :
Abteilung * :
4. Erlegedatum :
5. Erleger :
6. Wild-Nr. :
7. Eingangsdatum/Untersuchungsstelle **:
8. Untersuchungs-Nr. **:
9. Alter *** :

F
Ü
A

 Frischling
Überläufer
Bache, Keiler (mit Altersangabe)
10. Geschlecht *** :

m
w

 männlich
weiblich
11. Gewicht (in kg) :
12. Art der Jagd *** :

E
D

 Einzeljagd
Drückjagd
13. Spezielle Angaben/Bemerkungen
(z.B. Abgekommen, Krankheitserscheinungen, anderweitiger Tötungsgrund u.a.m.):
.....
.....
.....

.....
Datum

.....
Unterschrift

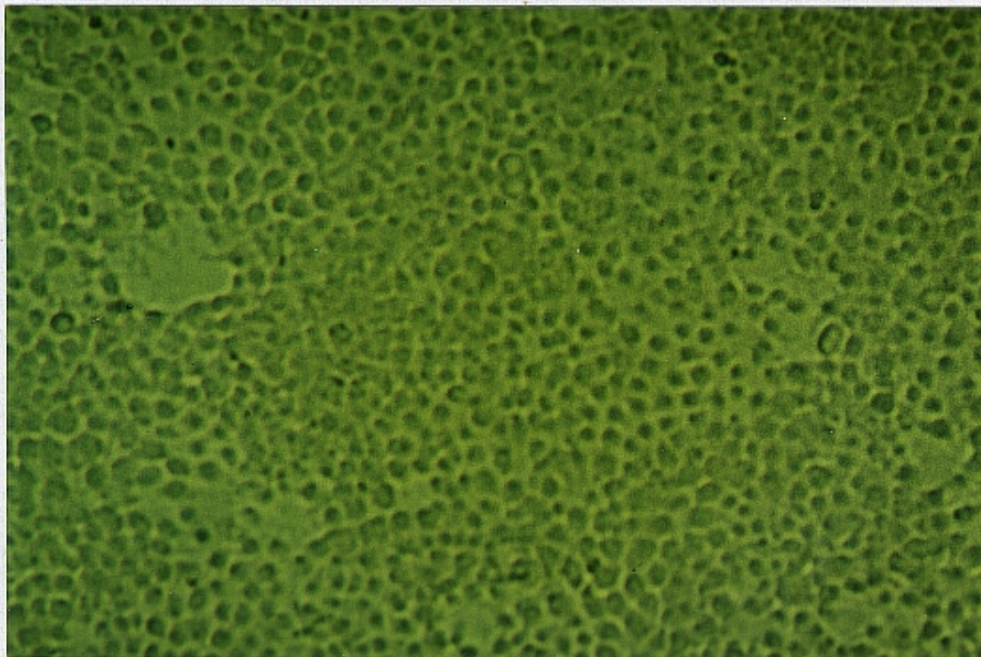
* - Angabe bei Bundes-/Verwaltungsjagden/Kommunalen Forstämtern
** - wird von der Untersuchungsstelle ausgefüllt
*** - Zutreffendes ankreuzen
**** - Nichtzutreffendes streichen

Hinweise zur Probenentnahme umseitig!

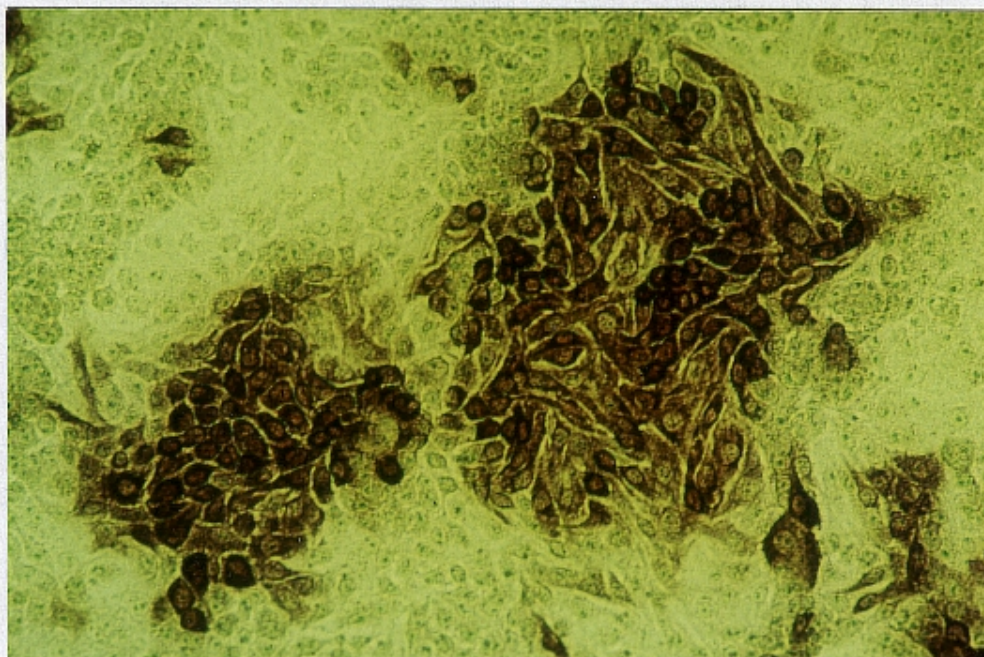
Nicht infizierte und mit KSPV infizierte PK15-Zellen

Wachstum in 24-Well-Zellkulturplatten, Vergrößerung 20x/0,35 (Objektiv)

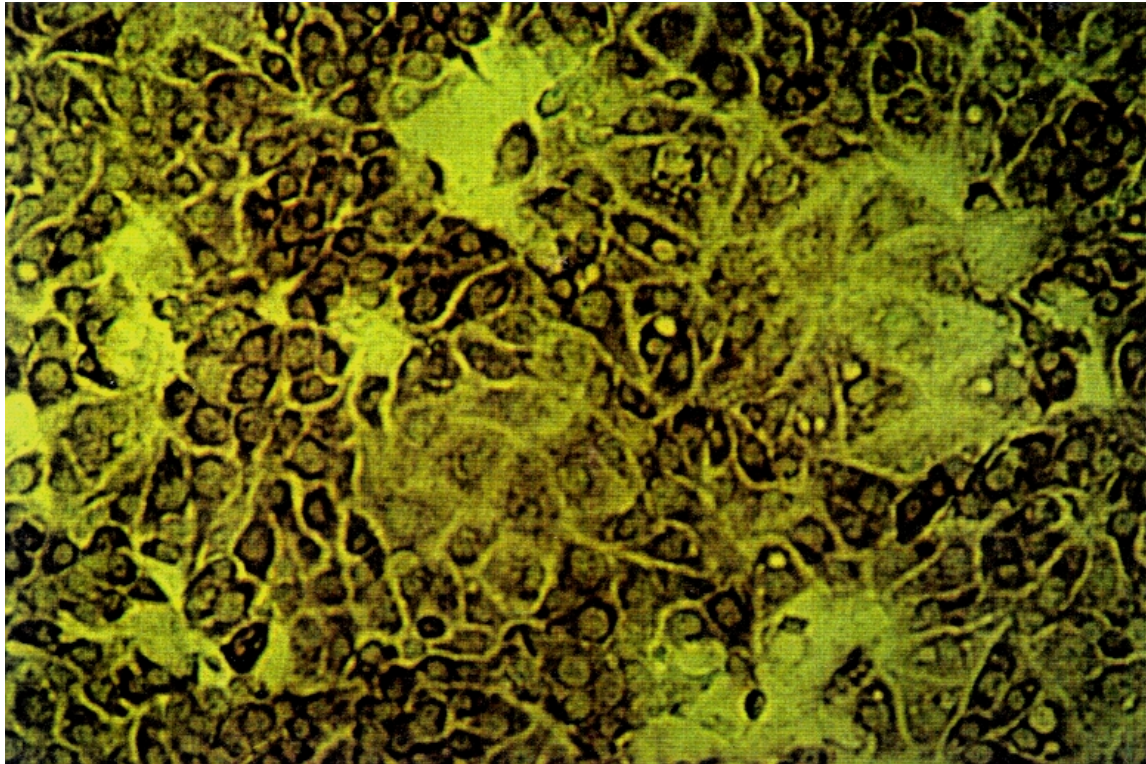
A: Nicht infizierte PK-15 Zellen



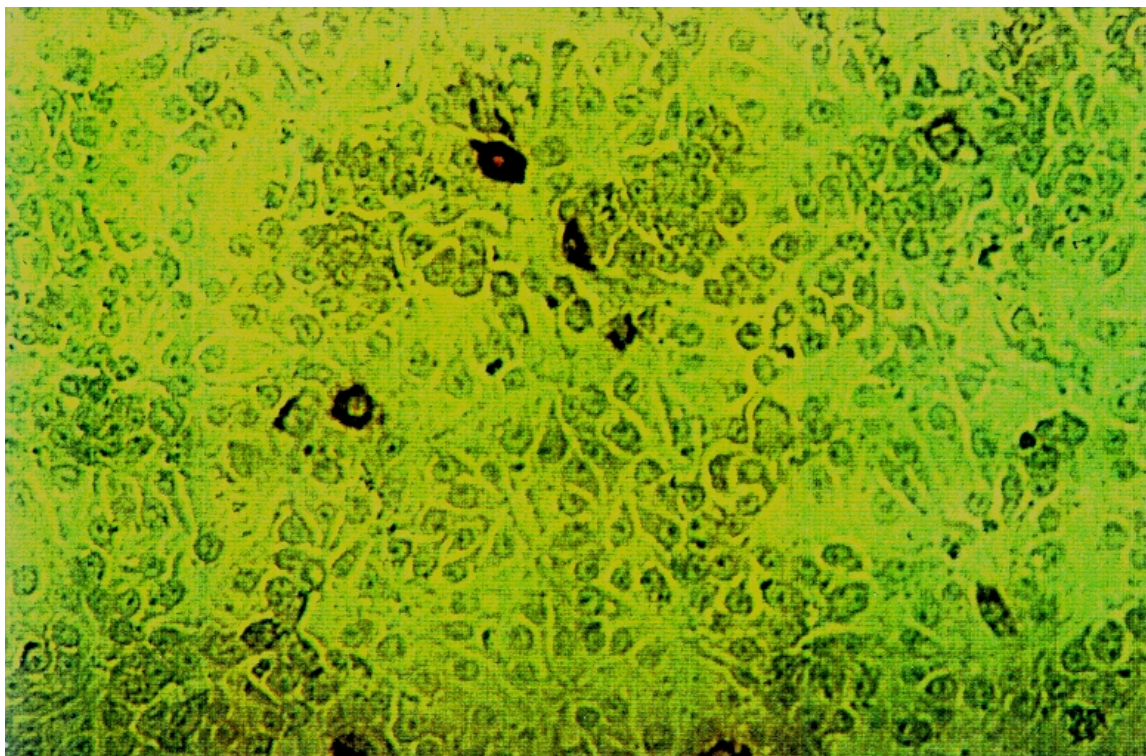
B: Nachweis von KSPV, welches von einem simultan oral immunisierten und mit einem schwachvirulenten Isolat infizierten Hausschwein stammt (7 d p.i.). Nachweis mit mAb-Mix



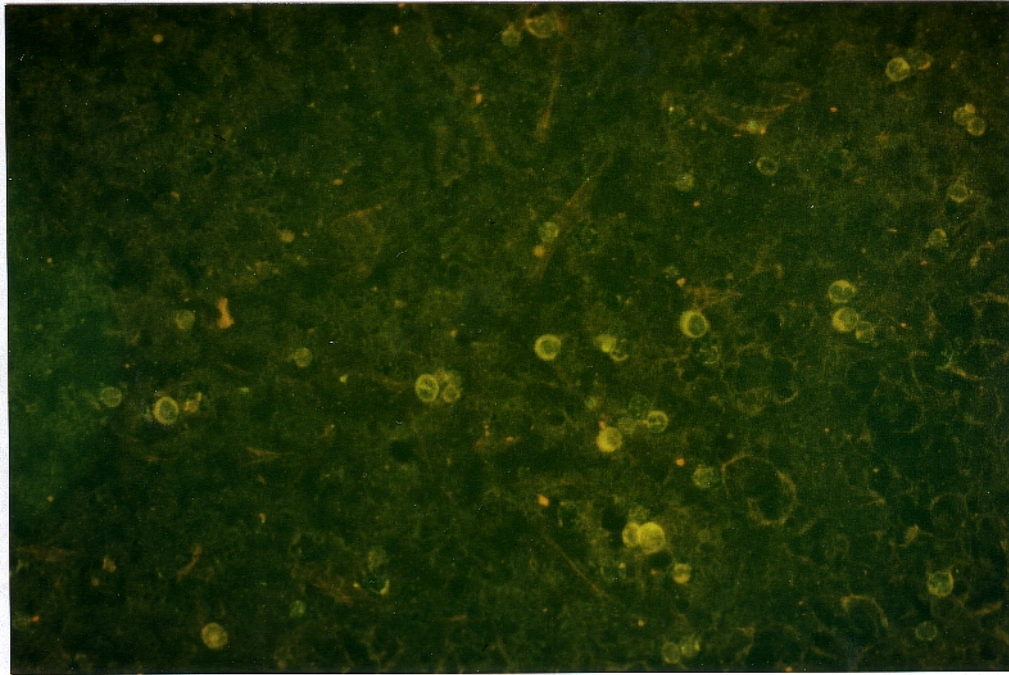
C: Nachweis von KSPV, welches von einem simultan oral immunisierten und mit einem hochvirulenten Virusstamm infizierten Hausschwein stammt (5 d p.i.). Nachweis mit mAb-Mix (Challengevirus)



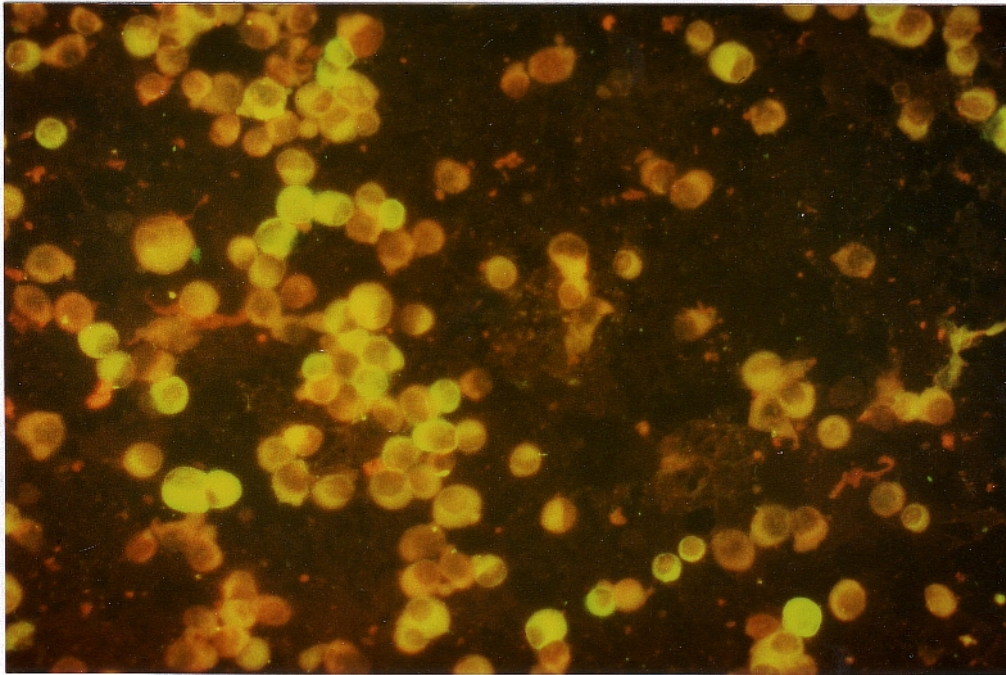
D: Dasselbe Virusisolat wie unter C, angezchtet unter identischen Bedingungen. Nachweis mit dem mAk C5 (Detektion von Impfvirus)



Nachweis von KSPV im Knochenmarksausstrich eines experimentell infizierten
Hausschweines mittels DIFT

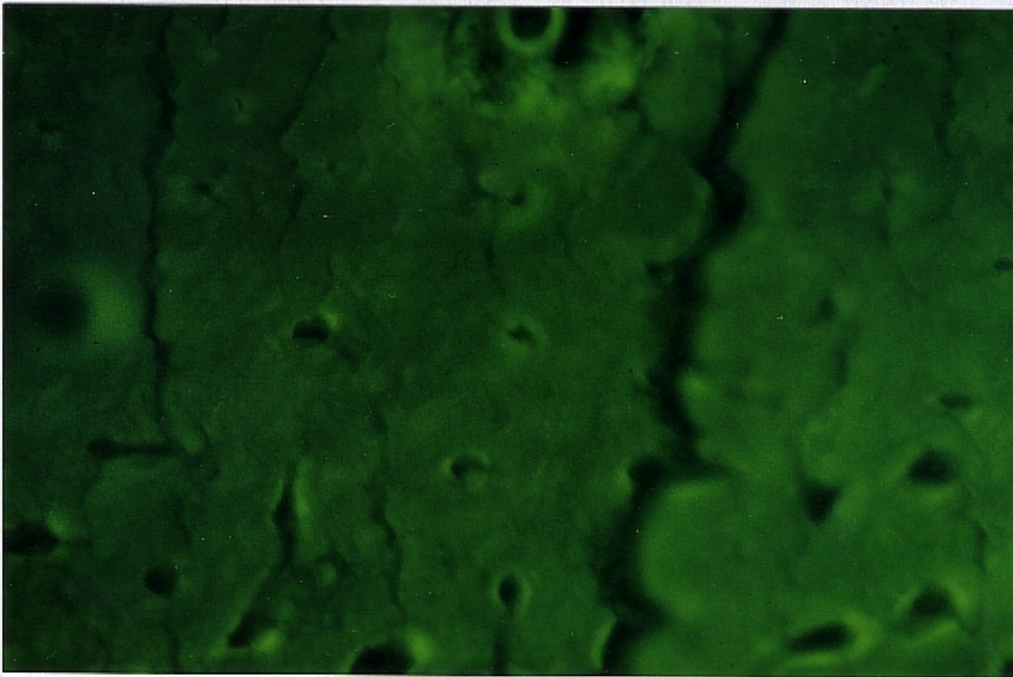


Nachweis von KSPV-Antikörpern in einem Serum mittels IIFT
(fluoreszierende PKSU-Zellen)

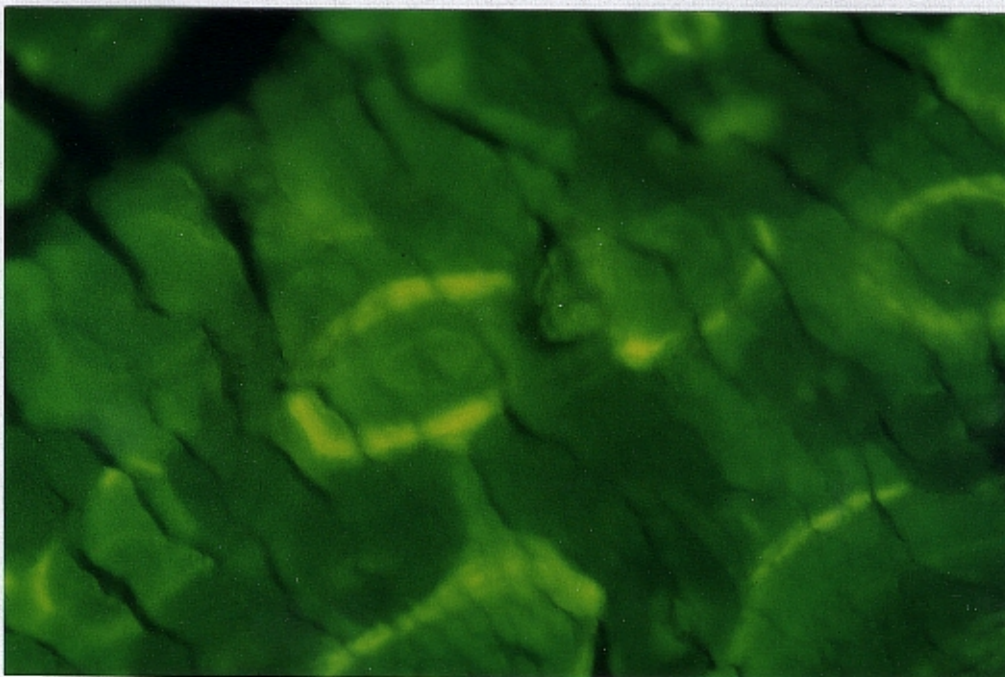


Gefrierschnitte von Mittelfußknochen von Wildschweinen bei Betrachtung im
Fluoreszenzmikroskop

OTC-negatives Tier



OTC-positives Tier



Danksagung

Herrn Dir. u. Prof. Dr. V. Kaden und Herrn Univ.-Prof. Dr. D. Ebner danke ich für die Überlassung und die wissenschaftliche Betreuung des Themas. Bei allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern des Instituts für angewandte Virologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Insel Riems möchte ich mich für die jederzeit gewährte Unterstützung in freundschaftlicher Atmosphäre ganz herzlich bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dir. u. Prof. Dr. V. Kaden, Frau Dr. E. Lange und Herrn Dr. U. Fischer, welche unmittelbar an dem Thema beteiligt waren. Für die zuverlässige technische Mitarbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau S. Hillmert und Frau S. Thürk. Für die bei der Durchführung der Tierversuche gewährte Hilfe durch die Mitarbeiter des Tierstalles möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Mein weiterer Dank gilt auch dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Oldenburg für die Durchführung der Arbeiten an der HPLC.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Forstämter der Landkreise Güstrow, Müritz und Ostvorpommern bedanken, welche mit ihrer Arbeit einen entscheidenden Anteil am Gelingen der Immunisierungsmaßnahmen haben. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Veterinärbehörden der drei Landkreise für die gute Zusammenarbeit.

Bei meinem Mann möchte ich mich für die fachlichen Anregungen und den immerwährenden Ansporn sowie bei meiner gesamten Familie für alle erdenkliche Hilfe bedanken.

Lebenslauf

02. 07. 1968 geboren in Merseburg als Tochter von Wilfried und Gerda Schurig, geb. Scholz
- 1975 - 1985 zehnklassige Allgemeinbildende Oberschule in Wallendorf und Merseburg
- 1985 - 1988 Berufsausbildung mit Abitur im VEG Halle zum Rinderzüchter
- 1988 - 1994 Studium der Veterinärmedizin an der Humboldt – Universität zu Berlin
- 1994 Approbation als Tierärztin
- 4 / 94 – 9 / 94 Mitarbeiterin im Biologisch-Chemischen Institut Hoppegarten (Mark)
- 10 / 94 – 12 / 96 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Insel Riems
- 1995 Heirat mit Matthias Fischer
- 1997 Geburt unseres Sohnes

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Langen, 18. 3. 1999