

Schweinepest-Überwachungsprogramm für Schweine in Freilandhaltung in schweinepestgefährdeten Gebieten

A classical swine fever surveillance programme for outdoor pigs in endemic regions

FKZ: 02OE071

Projektnehmer:

Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Virusdiagnostik
Boddenblick 5a, 17493 Greifswald - Insel Riems
Tel.: +49 38351 7144
Fax: +49 38351 7275
E-Mail: Klaus.Depner@fli.bund.de
Internet: <http://www.fli.bund.de/>

Autoren:

Depner, Klaus R.

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL)

Schlussbericht zum Forschungsauftrag 02OE071

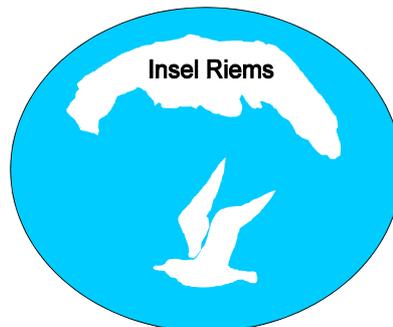
Februar 2003

Schweinepest-Überwachungsprogramm für Schweine in Freilandhaltung in schweinepestgefährdeten Gebieten - ein präventives Tiergesundheitskonzept zur Überwachung der Klassischen Schweinepest

(Ein Paradigmenwechsel in der Schweinepestbekämpfung)

Laufzeit: 13 Monate (01.12.2002 - 31.12.2003)

Ausführende Stelle: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
Institut für Virusdiagnostik
Boddenblick 5a
17493 GREIFSWALD-INSEL RIEMS



Projektleiter: *Dr. Klaus R. Depner*
Nationales Referenzlabor für Klassische Schweinepest

I N H A L T

1	Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	3
1.1	<i>Einleitung</i>	3
1.2	<i>Spezielle Problematik und Aufgabenstellung</i>	4
2	Wissenschaftlicher und technischer Stand	5
3	Planung und Ablauf des Projektes	6
4	Material und Methoden	6
4.1	<i>Real time RT-PCR</i>	6
4.2	<i>Untersuchungsmaterial</i>	7
4.3	<i>Fragebogen PCR</i>	7
5	Ergebnisse und Diskussion	7
5.1	<i>Spezifitätsprüfungen anhand von definierten Virusstämmen</i>	8
5.2	<i>Sensitivitätsprüfungen anhand von definierten Virusstämmen</i>	8
5.3	<i>Untersuchung von diagnostischem Probenmaterial</i>	8
5.4	<i>Auswahl der geeigneten Proben für die Routinediagnostik</i>	9
5.5	<i>Auswertung des PCR-Fragebogens</i>	10
6	Ableitung von Vorschlägen	10
6.1	<i>Die Ausgangssituation</i>	11
6.2	<i>Das diagnostische Dilemma</i>	11
6.3	<i>Die methodischen Voraussetzungen für eine Alternative</i>	12
6.4	<i>Vorschlag für eine neue Bekämpfungsphilosophie</i>	12
7	Die praktische Umsetzung	13
8	Offene Fragen und weiterer Forschungsbedarf	15
9	Zusammenfassung	17
10	Summary	18
11	Literatur	19
12	Anhang	21
	Fragebogen PCR	
	Tabellen	
	Abbildungen	

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

1.1 Einleitung

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine der wirtschaftlich folgenschwersten Tierseuchen weltweit und nimmt unter den Schweinekrankheiten als anzeigepflichtige Tierseuche eine zentrale Stellung ein (LIESS, 1987). Diese monokausale und virusbedingte Allgemeinerkrankung führte bei Haus- und Wildschweinen in den zurückliegenden Jahren zu schweren direkten und indirekten Verlusten. Im deutschen Hausschweinebestand wurden im Zeitraum 1993 bis 2002 insgesamt 2.431.846 Schweine seuchenbedingt getötet, davon rund 70.000 in den Jahren 2001/2002. Betroffen waren konventionelle sowie ökologisch bewirtschaftete Betriebe. Die ethische, tierschützerische und wirtschaftliche Dimension einer KSP-Epidemie verdeutlichen die Zahlen aus den Niederlanden aus den Jahren 1997/1998. Bei insgesamt 429 Ausbrüchen wurden mehr als 12 Millionen Schweine getötet und unschädlich beseitigt. Direkt von der Seuche betroffen waren allerdings nur ca. 700.000 Schweine (ca 6 %), die anderen Tiere wurden aus prophylaktischen und ökonomischen Gründen getötet. Die direkt entstandenen Kosten wurden mit 2,3 Milliarden EUR angegeben. Die indirekten Kosten, die allerdings nur schwer zu quantifizieren sind, wurden als ebenso hoch angegeben (HORST et al., 1999).

Die Bekämpfung der KSP stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Die allgemeinen Bekämpfungsmaßnahmen in der Europäischen Union, die in der EU-Richtlinie 2001/89/EC festgelegt sind, können wie folgt zusammengefasst werden:

- Keulen aller Schweine im Seuchenbetrieb,
- Einrichten von Sperr- und Beobachtungsgebieten,
- Transportverbote, Handelsrestriktionen,
- Umfangreiche epidemiologische, klinische, serologische und virologische Untersuchungen.

Zusätzlich können noch je nach Seuchenlage das prophylaktische Keulen aller Schweine im 500- bis 1000-m-Umkreis eines Seuchenherdes sowie die Notimpfung als spezielle Bekämpfungsmaßnahmen eingesetzt werden. Das Keulen im 1000-m-Radius wurde sowohl in Deutschland als auch in den Niederlanden während der letzten Seuchenzüge durchgeführt. Die Notimpfung wurde allerdings wegen zu strenger Auflagen seitens der EU noch nie eingesetzt.

Ziel dieser Bekämpfungsstrategie ist es, absolute Seuchenfreiheit in einer Region bzw. einem Land zu erlangen, damit der internationale Handel mit Schweinen und deren Produkten ungestört stattfinden kann. Diese Seuchenfreiheit wird darüber definiert, dass die Schweinepopulation frei von Antikörpern gegen das KSP-Virus sein muss.

Als sehr umstritten haben sich diese Bekämpfungsmaßnahmen in schweinedichten Gegenden erwiesen. Das Töten vorwiegend gesunder Tiere wird aus ethischen und tierschützerischen Gründen von der Bevölkerung immer weniger akzeptiert. Weiterhin schwindet beim Verbraucher das Verständnis für die Nichtimpfpolitik, zumal die Impfung keine negativen Effekte für Tiere und Menschen hat. Aus der früheren Anwendung der Vakzination ergeben sich zudem keine Beweise für eine Persistenz von KSP-Virus bei

geimpften Schweinen. Es muss noch betont werden, dass der Mensch nicht an der KSP erkranken kann und somit für ihn durch die Seuche unmittelbar keine Gefahr besteht.

1.2 Spezielle Problematik und Aufgabenstellung

Infizierte Wildschweine stellen ein permanentes KSP-Virusreservoir dar und gelten als eine der Hauptansteckungsquellen für Hausschweine (TEUFFERT et al. 1997, FRITZEMEIER et al. 2000). Alle KSP-Ausbrüche bei Hausschweinen der letzten Jahre in Deutschland traten in Gegenden auf, in denen die Schweinepest in der Wildschweinpopulation vorkommt (siehe Abbildung 1). Aufgrund der erhöhten Infektionsgefahr gelten in Gegenden, wo Schweinepest bei Wildschweinen vorkommt, strenge Überwachungsmaßnahmen und Handelsrestriktionen für alle schweinehaltenden Betriebe. Diese Maßnahmen beinhalten unter anderem das Verbot der Freilandhaltung von Schweinen sowie aufwändige und teure diagnostische Untersuchungen, die gemacht werden müssen, wenn z. B. Schweine aus einem Betrieb in einen anderen verbracht werden. Ganz besonders betroffen sind ökologisch bewirtschaftete Betriebe, in denen eine Freilandhaltung der Schweine in diesem Fall nicht mehr stattfinden darf.

Die prophylaktischen Maßnahmen in Restriktionsgebieten stützen sich auf klinische und labordiagnostische Untersuchungen, die in regelmäßigen Abständen sowie in Verdachtssituationen durchgeführt werden. Zusätzlich werden alle Tiere, die einen Betrieb verlassen, klinisch und labordiagnostisch untersucht. Für die Laboruntersuchungen werden kommerzielle Schnelltests (Antigen-ELISA) zum Nachweis von KSP-Virusantigen im Blut eingesetzt. Diese Tests sind allerdings wegen ihrer geringen Empfindlichkeit mit Sicherheitsmängeln behaftet und stellen somit ein gewisses Risiko dar.

Als Alternativmethode bietet sich seit einiger Zeit die diagnostische Polymerasekettenreaktion (PCR) an, die als Methode mit einer sehr hohen Sensitivität Einzug in die Veterinärmedizin gefunden hat (PATON et al., 2000 a/b). **Ziel des Forschungsprojektes war es, ein auf modernen Labormethoden (PCR) beruhendes Überwachungsprogramm für die KSP zu erarbeiten, das ethisch vertretbar sowie sicherer, effektiver und kostengünstiger sein soll als die zur Zeit praktizierten Überwachungsprogramme. Neben der Optimierung der Labordiagnostik soll die Strategie der Überwachungsuntersuchungen überdacht werden. Das neue Überwachungsprogramm soll die Möglichkeiten der ökologischen und konventionellen Schweinehaltung verbessern und das Infektionsrisiko allgemein minimieren mit dem Endziel, unnötige Keulungen zu vermeiden.**

Die Schweinepestbekämpfung ist in der EU gesetzlich geregelt (EU-Richtlinie 2001/89/EC). Für Deutschland gelten die Schweinepestverordnung, die EU-Schweinepestrichtlinie sowie der Bundesmaßnahmenkatalog zur Bekämpfung der KSP. Das Hauptziel des Forschungsvorhabens ist, die gewonnenen Erkenntnisse in die oben erwähnten Verordnungen und Richtlinien einfließen zu lassen. Denn jegliche Bekämpfungsmaßnahme kann nur dann praktisch umgesetzt werden, wenn sie in einem gesetzlichen Rahmen erfolgt. Das Nationale Referenzlabor für Schweinepest ist sowohl auf nationaler als auch auf europäischer Ebene direkt an

der Gestaltung und Umsetzung der Schweinepestbekämpfung beteiligt und ist somit in der Lage, die gesetzlich vorgegebenen Bekämpfungsstrategien durch neue wissenschaftliche Erkenntnisse zu ergänzen.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Infektion mit dem KSP-Virus kann anhand von klinischen Untersuchungen nur verdächtigt werden. Die Bestätigung eines Verdachtes muß mittels Labortests erfolgen (CARBREY, 1988; *Entscheidung der Kommission 2002/106/EG*). Prinzipiell stehen zwei methodische Wege zur Verfügung, die KSP zu diagnostizieren:

- der direkte Nachweis des Erregers oder von Teilen des Erregers,
- der Nachweis von Antikörpern, die das Tier infolge der Auseinandersetzung mit dem Virus gebildet hat (indirekter Nachweis).

Während der indirekte Nachweis hauptsächlich in seuchenfreien Zeiten als Mittel der Seuchenüberwachung dient, steht im Falle eines Seuchenverdachtes bzw. Ausbruchs der direkte Erregernachweis im Vordergrund. Der direkte Nachweis fußt in erster Linie auf dem Nachweis des Virus und seiner Antigene, wobei die zellkulturelle Virusisolierung als „Goldwährung“ gilt. Sie ist die Grundlage für die Seuchenbestätigung, hat allerdings den Nachteil, dass sie sehr zeitaufwändig und arbeitsintensiv und dadurch für Massenuntersuchungen unpraktikabel ist. Mitte der 90er Jahre fanden die kommerziell erhältlichen Antigen-ELISAs den Einzug in die direkte KSP-Diagnostik. Der Antigen-ELISA hat gegenüber der zellkulturellen Virusisolierung den Vorteil, dass viele Proben in kurzer Zeit untersucht werden können. Der Nachteil liegt in der geringen Sensitivität (KADEN et al., 1999). Dieses bedeutet, dass ca. 20 % der viruspositiven Tiere nicht erkannt werden. Bei den falsch negativen Reagenten handelt es sich hauptsächlich um frisch infizierte Schweine, die sich noch in der Inkubationszeit befinden und noch keine klinischen Symptome zeigen. Zu diesem Infektionszeitpunkt liegt der Antigengehalt im Blut noch unter der Nachweisgrenze der Antigen-ELISA. Erst wenn Krankheitserscheinungen auftreten, ist auch der Virusgehalt ausreichend hoch, um im Antigen-ELISA zu einem positiven Ergebnis zu führen. Somit kann der Antigen-ELISA als zuverlässiger Test nur bei erkrankten Tieren (Fieberphase) als eine Bestätigung des klinischen Verdachtes eingesetzt werden. Positive Ergebnisse im Antigen-ELISA müssen zudem gegenwärtig durch arbeits- und zeitaufwändige Virusisolierungen bestätigt bzw. abgeklärt werden.

Seit mehreren Jahren wird die PCR als ergänzende Methode für die KSP-Diagnostik im akuten Seuchenfall eingesetzt. Es gibt zahlreiche wissenschaftliche Publikationen zu diesem Thema (VILCEK et al., 1994; SANDVIK et al., 1997; HYNDMAN et al., 1998; PATON et al., 2000 a/b; BARLIC-MAGANJA et al., 2001; RISATTI et al., 2003). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die PCR als sensitive Untersuchungsmethode erwiesen hat und dass sie mittlerweile als ein etabliertes Verfahren in der postmortalen Schweinepestdiagnostik (Diagnostik am toten oder moribund getöteten Tier) gilt. Aussagen zum Wert der PCR zur Untersuchung am lebenden Tier (Blut) liegen gegenwärtig noch nicht in verallgemeinerungsfähigem Maße vor und sind Gegenstand dieses Forschungsvorhabens.

Bei der PCR handelt es sich um eine enzymvermittelte Labortechnik zur Vermehrung (Amplifikation) eines definierten DNA-Abschnitts, welcher sich zwischen zwei Regionen mit bekannten Nukleotidsequenzen befindet. Die PCR als diagnostische Methode liefert einen Nachweis von Virusnukleinsäure, also einen direkten Nachweis der Infektion. Da allerdings das KSP-Virus kein DNA-Virus, sondern ein RNA-Virus ist, ist ein zusätzlicher Reaktionsschritt vor der eigentlichen PCR erforderlich. In diesem Schritt wird die RNA in eine cDNA (*copy DNA*) mit Hilfe eines speziellen Enzyms "umgeschrieben" (reverse Transkription). Kommerziell sind mehrere RNA-Isolierungskits für unterschiedliches Probenmaterial (Blut, Gewebe) erhältlich. Die Arbeiten in dieser Studie wurden mit den Produkten der Firma *Qiagen* durchgeführt.

3 Planung und Ablauf des Projektes

Die Forschungsarbeit wurde in zwei Phasen durchgeführt. Im ersten (methodischen) Teil der Arbeit (Dezember 2002 bis Oktober 2003) wurde die PCR-Methodik für die *in vivo*-Diagnostik (Diagnostik am lebendem Tier) etabliert und evaluiert (**1. Meilenstein**). Im zweiten Teil (November, Dezember 2003) wurden anhand der Ergebnisse aus dem ersten Teil Seuchenüberwachungskonzepte erarbeitet (**2. Meilenstein**). Mehrere Strategien für unterschiedliche Seuchenszenarien werden aufgezeigt und in ein Überwachungs- und Bekämpfungskonzept eingearbeitet.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Meilensteinen wurde im April dieses Jahres anhand eines Fragebogens eine Befragung aller veterinärmedizinischen Untersuchungseinrichtungen zum Thema PCR durchgeführt. Es ging hauptsächlich darum, die praxisrelevanten Parameter zu ermitteln.

Der Ablauf des Projektes erfolgte planmäßig und die anvisierten Meilensteine wurden erreicht.

4 Material und Methoden

4.1 Real time RT-PCR

Bei der in dieser Studie eingesetzten PCR handelt es sich um eine sogenannte "**real time RT-PCR**" (HIGUCHI et al., 1993). Bei dieser RT-PCR werden neben den üblichen Primern zusätzlich spezifische Sonden (Probes) verwendet, die das Ablesen des Ergebnisses in einem speziellen PCR-Gerät in "Echtzeit" (real time) ermöglichen. Zur Optimierung der real time RT-PCR wurde die Amplifikationseffizienz eines definierten DNA-Abschnittes mit unterschiedlichen Primerpaaren in Kombination mit verschiedenen Detektionssonden untersucht. Bei den Primern und Sonden handelt es sich um kurze Nukleinsäureketten, die spezifisch an den zu amplifizierenden Nukleinsäureabschnitt binden und die Polymerisation dieses Abschnittes einleiten. Die Auswahl der Primer und Sonden erfolgte nach Ermittlung einer KSPV-Konsensus-Sequenz mit 78 Sequenzen aus der 5' nicht translatierten Region (5'-NTR) des KSP-Virusgenoms. Insgesamt wurden 5 Primerpaare in Kombination mit 4 Detektionssonden ausgewählt. Die Testung aller möglichen Primer-Sonden-Kombinationen hinsichtlich Spezifität und Sensitivität erfolgte anhand einer Palette

von 90 KSP- und KSP-verwandten Viren (Pestiviren). Bei den getesteten Pestiviren handelt es sich um Vertreter aller Genotypen.

4.2 Untersuchungsmaterial

Das Referenzlabor für Schweinepest besitzt eine umfangreiche Sammlung von Referenzmaterialien, die für die Forschungsarbeiten zur Verfügung standen. Bei dem Probenmaterial handelt es sich um Blutproben von Schweinen aus Infektionsversuchen. In diesen Versuchen wurden die Schweine mit KSP-Virus infiziert und in regelmäßigen Abständen nach der Infektion beprobt. Bei der Wahl des Probenmaterials für dieses Forschungsvorhaben wurde darauf geachtet, dass Material aus allen klinischen Phasen der KSP-Erkrankung (Inkubation, akut-letal, akut-transient, subakut, chronisch, Rekonvaleszenz) verwendet wurde. Anhand dieses Probenmaterials wurde die RT-PCR als diagnostischer Test im Vergleich zum Antigen-ELISA sowie der zellkulturellen Virusisolierung validiert und die diagnostische Tauglichkeit für die Tierseuchenüberwachung wurde ausgelotet. Insgesamt wurden mehr als 300 Blutproben aus Infektionsversuchen mittels RT-PCR mehrfach getestet. Es wurde sowohl mit Serum als auch mit Vollblut gearbeitet.

Außer dem Probenmaterial aus Infektionsversuchen wurden auch 100 Serumproben von Schweinen aus definiert seuchenfreien Gegenden untersucht. Mittels dieser "Feldproben" wurde die Spezifität der RT-PCR zusätzlich überprüft.

Um die maximale Sensitivität der RT-PCR zu ermitteln, wurden definierte KSP-Virusverdünnungen hergestellt und getestet. Es galt zu klären, bis zu welcher Virusverdünnung mittels RT-PCR ein korrektes Ergebnis zu erwarten ist. Des Weiteren wurden positive Proben mit negativen Proben gepoolt und untersucht. Die praktische Intention war, die maximale Größe eines zu untersuchenden Pools zu bestimmen.

4.3 Fragebogen PCR

Ein Fragebogen zur RT-PCR wurde an 32 Veterinäruntersuchungseinrichtungen in Deutschland verschickt (siehe Anhang). Die potentiellen zukünftigen Anwender konnten ihre Anforderungen bzw. Wünsche bezüglich der Qualität der RT-PCR (Sensitivität, Spezifität, zu untersuchendes Material, technische Parameter, etc.) äußern.

5 Ergebnisse und Diskussion

Aus diagnostischer Sicht läßt sich die Qualität eines Testsystems, in unserem Fall der RT-PCR, über die Sensitivität und Spezifität am besten charakterisieren. Die Sensitivität ist die Fähigkeit der RT-PCR, ein positives Ergebnis zu liefern, wenn im Untersuchungsmaterial KSP-Virusgenom tatsächlich vorhanden ist. Die Spezifität einer RT-PCR ist die Fähigkeit, ein negatives Ergebnis zu liefern, wenn kein KSP-Virusgenom vorhanden ist. Ein negatives Testergebnis muss auch bei Proben geliefert werden, die positiv sind für das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD-Virus) bzw. für das Border Disease (BD) Virus (beides KSP-verwandte Pestiviren).

Die Wahl und damit die Funktionsfähigkeit der Primer ist ausschlaggebend für die Qualität der RT-PCR. Die Primer und Sonden müssen so gewählt werden, dass sie einerseits nur KSP-Virus erkennen und keine falsch positiven Ergebnisse produzieren. Andererseits sollte der Test so sensitiv sein, dass auch die geringsten Spuren an Virus nachgewiesen werden können.

5.1 Spezifitätsprüfungen anhand von definierten Virusstämmen

Von den 5 Primerpaaren, die in Kombination mit 4 Detektionssonden anhand einer Palette von 81 KSP- und KSP-verwandten Viren getestet wurden, erwies sich eine Primer/Sondenkombination ausschließlich spezifisch für KSP-Virus (erkennt nur KSP-Virus). Es erkannte alle 36 Vertreter der unterschiedlichen KSPV-Genotypen. Darunter befinden sich alle KSP-Virusstämme, die bei den Seuchenzügen der vergangenen Jahre in Deutschland und Europa isoliert wurden. Somit ist sichergestellt, dass alle bekannten KSP-Virusstämme erkannt werden. Die 45 getesteten Vertreter der verwandten Pestiviren wurden korrekterweise nicht erkannt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

5.2 Sensitivitätsprüfungen anhand von definierten Virusstämmen

Die Sensitivität wurde zuerst *in vitro* an virushaltigem Zellkulturüberstand ermittelt. Dafür wurden unterschiedliche KSP-Virusstämme in log₁₀-Schritten verdünnt und parallel mittels RT-PCR und zellkultureller Virusisolierung (Goldstandard) getestet. In Tabelle 2 werden diese Untersuchungen exemplarisch am Beispiel zweier KSP-Viren, ein Laborstamm und ein Feldstamm, dargestellt. Bei den aus den Seuchenausbrüchen stammenden KSP-Virusisolaten war die Sensitivität der RT-PCR gegenüber der Virusisolierung um eine 10er Potenz höher (z. B. bei dem KSP-Virusstamm Uelzen). Im Gegensatz dazu war die Sensitivität der RT-PCR für den zelladaptierten Laborstamm KSPV-Alfort um eine 10er Stufe niedriger. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass das KSP-spezifische System für Feldviren sehr sensitiv ist. Dies bedeutet, dass ca. 10 bis 100 RNA-Kopien pro Untersuchungsansatz erkannt werden. Diese hohe Sensitivität kann auch praktisch genutzt werden, indem mindestens 10 Proben gepoolt werden können, ohne den Verlust der diagnostischen Empfindlichkeit zu befürchten.

5.3 Untersuchung von diagnostischem Probenmaterial

Letztendlich entscheidend für die Qualität des RT-PCR-Systems ist die Frage, ob ein an KSP erkranktes Tier als solches erkannt wird und in welchen Stadien der Erkrankung positive Ergebnisse zu erwarten sind. Mittels Virusisolierung, die den Stellenwert des Goldstandards mit 100 %iger Sensitivität einnimmt, werden alle infizierten Tiere sowohl gegen Ende der Inkubationszeit als auch während der gesamten klinischen Phase als Virusträger identifiziert. Es werden auch Tiere erkannt, die nur milde Krankheitserscheinungen zeigen. Im Gegensatz dazu erkennt der Ag-Elisa nur Tiere, die ausgeprägte klinische Krankheitserscheinungen haben. Ca. 20 % der Proben von infizierten Tieren werden mit dieser Methode nicht erkannt. Insbesondere bleiben milde oder subklinische Verlaufsformen unerkannt. Um die Frage nach der "biologischen" Sensitivität der RT-PCR zu klären, wurden Blutproben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion entnommen wurden, mit der RT-PCR untersucht.

Die Untersuchungen haben ergeben, dass die Sensitivität der RT-PCR höher ist als die der Virusisolierung bzw. des Ag-ELISAs. Mittels Virusisolierung wird z. B. ein infiziertes Schwein am fünften Tag nach der Infektion zum ersten Mal als positiv erkannt, mittels RT-PCR wird das Tier bereits schon am 3. Tag als infiziert diagnostiziert. In den Tabellen 3 und 4 und in den Abbildungen 2 und 3 werden die Verlaufsuntersuchungen mittels Virusisolierung, Ag-ELISA, Neutralisationstest (Antikörpernachweis) und RT-PCR exemplarisch bei zwei Schweinen dargestellt.

Die Vorteile der RT-PCR gegenüber den anderen Testverfahren liegen besonders in der Erkennung positiver Tiere während der späten klinischen bzw. frühen Rekonvaleszenzphase. Schweine, die infolge einer potenten Immunabwehr nicht an KSP sterben, bilden ab der 2. Infektionswoche neutralisierende Antikörper, die das KSP-Virus im Blut neutralisieren. Das bedeutet, dass der Erregernachweis mittels zellkultureller Virusisolierung ab dem Zeitpunkt, wo Antikörper im Blut nachweisbar sind (frühe Rekonvaleszenzphase), negativ ausfällt. Mit der RT-PCR hat man den Vorteil, dass in der frühen Rekonvaleszenz virale Nukleinsäure trotz Antikörper noch nachweisbar ist. Dadurch ist die Sensitivität der RT-PCR höher als die der anderen Testsysteme und das diagnostische Fenster für den direkten Erregernachweis vergrößert sich nach hinten. Wird mit der RT-PCR bei einem infizierten Tier keine Nukleinsäure mehr nachgewiesen, bedeutet das, dass dieses Tier auch kein KSP-Virus ausscheidet und somit auch keine anderen Tiere anstecken kann. Die RT-PCR erweist sich als die sicherste Nachweismethode für die Bestätigung der Virusfreiheit.

Die Tatsache, dass KSP-Antikörper in der zu untersuchenden Probe den RT-PCR-Nachweis nicht negativ beeinflussen, konnte zusätzlich *in vitro* bestätigt werden. Antikörperhaltiges Serum wurde mit KSP-virushaltigem Serum versetzt und für eine Woche bei 4 °C bzw. 37 °C gelagert. Trotz dieser relativ langen Inkubationszeit konnte mittels RT-PCR der Erreger nachgewiesen werden. Dieser Befund ist auch insofern wichtig, dass, wenn unter Praxisbedingungen mehrere Proben gepoolt werden sollten, antikörperhaltige Proben keinen negativen Einfluss auf die Detektion eines eventuell positiven Reagenten haben würden.

Anhand des negativen Untersuchungsmaterials (100 Serumproben von Schweinen aus definiert seuchenfreien Gegenden) konnte der Beweis erbracht werden, dass die RT-PCR hoch spezifisch ist und dass keine falsch-positiven Ergebnisse zu erwarten sind. Alle untersuchten Proben waren negativ in der RT-PCR.

5.4 Auswahl der geeigneten Proben für die Routinediagnostik

Das Untersuchungsergebnis ist abhängig von der Art des Untersuchungsmaterials (Vollblut oder Serum). Das KSP-Virus vermehrt sich in den weißen Blutzellen. Somit ist Vollblut das geeignete Untersuchungsmaterial, da die Leukozyten Bestandteil der Probe sind. Im Gegensatz dazu befindet sich im Blutserum nur Virus, das aus den Leukozyten bereits freigegeben wurde. Demzufolge ist theoretisch die Viruslast im Serum geringer als im Vollblut. Die Sensitivität der RT-PCR sollte daher mit Vollblutproben höher sein als mit Serumproben. Um dieses zu überprüfen, wurden Paralleluntersuchungen mit Serum und Vollblut von zwei Tieren durchgeführt. Die Ergebnisse eines Tieres sind exemplarisch in Tabelle 5 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass besonders gegen Ende der virämischen Phase die Sensitivität

der RT-PCR mit Vollblutproben tatsächlich höher ist. Dies lässt sich dadurch erklären, dass zu diesem Zeitpunkt der Infektion das Tier Antikörper bildet, die das Virus im Serum neutralisieren. Trotz der etwas geringeren Sensitivität hat das Serum als Untersuchungsmaterial gewisse Vorteile. So können Serumproben parallel zur RT-PCR-Untersuchung auch für den Antikörpernachweis verwendet werden. Es gilt abzuwägen, ob dieser Sensitivitätsverlust diagnostisch relevant ist. Hinzu kommt, dass die Sensitivität der RT-PCR bei der Untersuchung von Serumproben trotzdem nicht geringer war als die Sensitivität der zellkulturellen Virusisolierung.

5.5 Auswertung des PCR-Fragebogens

Der Fragebogen wurde insgesamt an 32 Untersuchungseinrichtungen versandt, von denen 21 geantwortet haben. Die Auswertung des Fragebogens (siehe Anhang) hat sich sehr hilfreich für die Laborarbeiten sowie für die Erstellung der Untersuchungsprogramme für die KSP-Seuchenbekämpfung erwiesen. Die Befragung hat ergeben, dass ein zugelassenes real time RT-PCR-System zum Nachweis von KSP-Genom von allen Teilnehmern befürwortet wird. Wünschenswert wäre, RT-PCR-Systeme zu haben, die sowohl KSP-spezifisch als auch Panpesti-spezifisch sind. Neben der besonderen Bedeutung der KSP-Spezifität werden eine „one tube RT-PCR“, eine interne Prozesskontrolle und die Robustheit des Test als wichtigste Kriterien benannt. Das Poolen von max. 10 Proben wird von den meisten Kollegen als Höchstgrenze empfohlen. Ein alternatives RT-PCR-System zur Verifizierung von RT-PCR-Ergebnissen wird gewünscht. Die Kosten der RT-PCR müssen geringer als oder gleich der Kosten des Ag-ELISAs sein.

6 Ableitung von Vorschlägen

Ursprünglich war das Forschungskonzept darauf ausgerichtet, ökologisch bewirtschafteten Betrieben, die durch seuchenhygienischen und seuchenprophylaktische Maßnahmen nicht mehr unter ökologischen Gesichtspunkten wirtschaften können, Wege aus dem Dilemma zu zeigen. So kann bedingt durch KSP-Ausbrüche z. B. bei Wildschweinen eine Freilandhaltung der Hausschweine nicht mehr stattfinden. Zudem kommen noch Handelsrestriktionen und wirtschaftliche Einbußen dazu. Die ursprünglich anfängliche Idee war, dass solche Betriebe zusätzlich mittels RT-PCR-Untersuchungen kontrolliert werden sollen, damit sie ihre ökologischen Produkte weiterhin erzeugen und vermarkten können. Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass das diagnostische Potential der RT-PCR viel größer ist, als dass sie nur als ein "zusätzliches" Mittel eingesetzt werden sollte. Ein Paradigmenwechsel in der KSP-Bekämpfung deutete sich an und steht nunmehr zur Diskussion.

Eine erweiterte, vom Prinzip her neue Bekämpfungsphilosophie wurde aufgestellt, die ihre Gültigkeit sowohl für konventionell bewirtschaftete Betriebe als auch für die ökologische Landwirtschaft hat. Die hier aufgezeigte praktische Umsetzung des Bekämpfungsmodells kann somit für alle Schweinebetriebe gelten.

6.1 Die Ausgangssituation

Bevor Verbesserungsvorschläge gemacht werden, soll vorab die jetzige KSP-Bekämpfungsstrategie bzw. Bekämpfungsphilosophie erläutert werden.

Die KSP wird in erster Linie bekämpft, weil sie dem freien Handel mit Schweinen bzw. mit Schweinefleisch im Wege steht. Um diese Handelsbarrieren zu beseitigen, wurde Ende der 70er Jahre in der EU beschlossen, die KSP zu tilgen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde 1980 eine Strategie eingeführt, die konsequent das Impfen verbietet und das Keulen als Hauptbekämpfungsmaßnahme vorschreibt. Diese Strategie wurde als einzig praktikabler Weg angesehen, der die Liberalisierung des Handels und die Errichtung eines Binnenmarktes garantiert. In letzter Konsequenz bedeutet es aber, dass ein Land oder eine Region nur dann den Status der KSP-Freiheit bei Hausschweinen erlangen kann, wenn die Hausschweinepopulation sowohl frei von KSP-Virus als auch von Antikörpern gegen das KSP-Virus ist. Die jetzige Bekämpfungsstrategie basiert auf folgenden Annahmen:

- Nur von seronegativen (antikörperfreien) Schweinepopulationen geht keine KSP-Gefahr aus, denn nur antikörperfreie Populationen erlauben eine effiziente Diagnostik, die sichere KSP-Freiheit garantiert.
- Von seropositiven Schweinen kann eine Gefahr ausgehen, daher müssen diese eliminiert werden (Seropositive Tiere stören das System der effizienten Diagnostik in freien Populationen und werden daher gekeult.).
- Da mit konventionellem Impfstoff gegen KSP geimpfte Schweine seropositiv sind, müssen diese ebenfalls gekeult werden.
- Impfung gegen KSP stört die Diagnostik und erfolgt i. d. R. nur bei Anwesenheit des Virus (Wer gegen KSP impft, der hat auch KSP in seiner Schweinepopulation - sonst bräuchte er nicht zu impfen.).
- Eine konventionell geimpfte Schweinepopulation gilt nicht als KSP-frei solange seropositive Tiere nachweisbar sind.
- Seuchenfreiheit wird durch die KSP-Antikörperfreiheit einer ganzen Population definiert.

Als Folge der aufgelisteten Annahmen wird auch für virusfreie Regionen die KSP-Antikörperfreiheit gefordert, um damit den Status der KSP-Freiheit zu belegen. Die serologischen Nachweise sind somit entscheidend dafür, ob ein Land oder eine Region als seuchenfrei eingestuft wird, um frei handeln zu können. Der direkte Erregernachweis spielt nur während der Seuchenfeststellung und Seuchentilgung eine primäre Rolle.

6.2 *Das diagnostische Dilemma*

Die seit Jahren verfügbaren serologischen Tests zum Nachweis von Antikörpern, der Neutralisationstest und der Antikörper-ELISA, haben sich als sehr sicher, sensitiv und spezifisch erwiesen. Der Antikörper-ELISA ist zusätzlich sehr gut für Massenuntersuchungen geeignet. Mittels dieser Tests kann die Antikörperfreiheit und somit auch indirekt die Erregerfreiheit in einer Schweinepopulation relativ einfach überwacht werden. Diese Tests bilden die Basis für die jetzige Bekämpfungsstrategie. Ihr Hauptnachteil besteht jedoch in der fehlenden Unterscheidung von Infektions- und Impfantikörpern (DIVA-Prinzip: *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*). Somit ist zur Zeit die Impfung als Instrument der Seuchenbekämpfung nur schwer einsetzbar, denn geimpfte Tiere werden als KSP-

positiv diagnostiziert. Bei der aktuellen Bekämpfungsstrategie ist somit das Impfverbot eine wichtige Voraussetzung.

6.3 Die methodische Voraussetzung für eine Alternative

Die wünschenswerte Alternative muss kostengünstig, schnell und mit hoher Sicherheit die Erregerfreiheit **direkt und unabhängig vom Antikörperstatus** des Tieres bestätigen. Voraussetzung dafür ist, dass innerhalb des Bekämpfungssystems der direkte Erregernachweis einen neuen Stellenwert erhält. Diese Forderung konnte bislang nicht erfüllt werden, da die verfügbaren direkten Nachweisverfahren (Virusisolierung und Antigen-ELISA) dazu nicht in der Lage sind. Die sehr sensitive Virusisolierung in Zellkulturen eignet sich nicht für Massenuntersuchungen und der Antigen-ELISA verfügt nicht über die nötige Sensitivität und Spezifität. Ein für die Massenuntersuchung geeignetes Verfahren muss aber über eine hohe Sensitivität, Spezifität und Robustheit verfügen, und es soll zudem schnell, praktisch in der Handhabung und preisgünstig sein.

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde eine RT-PCR für die *in vivo* Diagnostik etabliert, die die genannten Bedingungen erfüllt. Es steht somit zum ersten Mal ein Nachweisverfahren für die direkte KSP-Diagnostik zur Verfügung, das das Potential besitzt, die alten Verfahren zu ergänzen bzw. zu ersetzen. Die Sensitivität der RT-PCR ist gleich bzw. höher als die der Virusisolierung (Goldstandard). Sie ist spezifisch, da nur KSP-Viren (Genom von KSP-Virus) erkannt werden. Verwandte Pestiviren werden nicht detektiert. Die Testdauer von einem Tag ist vergleichbar kurz mit der der ELISA. Kommerziell erhältliche RNA-Extraktionsautomaten und Pipettierroboter ermöglichen den Einsatz in der Massenuntersuchung. Aufgrund der hohen Sensitivität können zudem mehrere Proben gepoolt werden, so dass die Untersuchungskosten niedrig gehalten werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die real time RT-PCR die Vorteile der Antigen-ELISAs und der Virusisolierung vereint. Sie eröffnet somit neue diagnostische Möglichkeiten und ermöglicht neue Wege in der Seuchenbekämpfung.

6.4 Vorschlag für eine neue Bekämpfungsphilosophie

Die RT-PCR erlaubt es, die Methoden zur Bekämpfung und Überwachung der Schweinepest neu zu überdenken. Durch Verlagerung des Schwerpunktes der Untersuchungen vom Antikörpernachweis auf den Erregernachweis entsteht folgende neue Bekämpfungsphilosophie:

- **Definition der Seuchenfreiheit ist zukünftig auch anhand der Erregerfreiheit möglich**
- **Überwachung und Zertifizierung der Erregerfreiheit mittels real time RT-PCR**
- **Gezielter Einsatz im Seuchenfall, um die unnötige Keulung gesunder, virusfreier Tiere zu verhindern**
- **Ergänzung zum „stand still“ und zur serologischen Überwachung.**

Wegen der hohen Sensitivität und Spezifität der RT-PCR-Methode ist davon auszugehen, dass bei dieser Bekämpfungsstrategie kein höheres diagnostisches Risiko entsteht als bisher. Das System würde sogar zusätzliche Sicherheit bieten, da direkt nach dem Erreger gesucht wird. Impfmaßnahmen würden in den betroffenen Gebieten (Schutzzone und Beobachtungsgebiet) als zusätzliches Bekämpfungsmittel die Seuchenüberwachung nicht negativ beeinflussen. Eine massenhafte Keulung der Tiere in schweinedichten Gegenden würde drastisch reduziert, denn es werden nur die Herden gemäßregelt, in denen KSP-Virus mittels RT-PCR nachgewiesen wurde. Alle Schweinebetriebe, für die Erregerfreiheit nach RT-PCR-Untersuchung zertifiziert werden kann, können innerhalb einer Frist geschlachtet und das Fleisch kann frei gehandelt werden. Ein zusätzlicher Vorteil wäre, dass verwandte Pestiviren, die im jetzigen direkten Nachweisverfahren diagnostische Probleme verursachen, keine Probleme mehr bereiten würden.

Um die Vorteile der neuen Strategie nochmals zu betonen, sollten wir uns die Seuchenzahlen aus den Niederlanden aus den Jahren 1997/1998 in Erinnerung rufen. Es wurden mehr als 12 Millionen Schweine getötet, obwohl direkt von der Seuche nur ca. 700.000 (~ 6 %) Schweine betroffen waren. Die gesunden Tiere wurden aus prophylaktischen und ökonomischen Gründen getötet und unschädlich beseitigt. Bei einer Bekämpfungsstrategie, die direkt den Erregernachweis verfolgt, hätten voraussichtlich ca. 90 % der Schweine nicht gekeult werden müssen.

Zusammengefasst:

- **Eine erweiterte Bekämpfungsstrategie, die den direkten Erregernachweis mittels RT-PCR nutzt, führt zu keinem höheren Seuchenrisiko als die jetzige Strategie.**
- **Impfmaßnahmen wären als zusätzliches Bekämpfungsmittel durchführbar und sollten als wichtiger Bestandteil integriert werden. Die Impfung kann dabei mit attenuierten Lebendvakzinen erfolgen.**
- **Beim Einsatz von markierten Vakzinen wäre die RT-PCR Teil einer DIVA-Strategie (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*).**
- **Es würden Herden gemäßregelt werden, in denen KSP-Virus nachgewiesen wurde. Das Keulen eines Großteils der Tiere würde entfallen.**
- **Zertifizierte Erregerfreiheit nach RT-PCR-Untersuchung würde das Schlachten der Schweine und den freien Handel mit Schweinefleisch ermöglichen, unabhängig von der allgemeinen KSP-Situation im Land.**
- **Serologische Nachweisverfahren können bei einer Nichtimpfpolitik oder einer Impfstrategie mit Markerimpfstoffen weiterhin eingesetzt werden.**

7 Die praktische Umsetzung

Zusätzlich ist die Frage zu beantworten, wie oft und wie intensiv eine Herde bzw. eine Schweinepopulation innerhalb einer definierten Region mittels RT-PCR untersucht werden muss. Abhängig von der Seuchensituation und von der Art des Betriebes sind prinzipiell mehrere Vorgehensweisen möglich. Das Vorgehen richtet sich nach dem Risiko einer Region bzw. Herde, sich mit KSP-Virus zu infizieren.

- a) *Untersuchungen mittels RT-PCR im Rahmen von Handelsuntersuchungen in Gebieten ohne KSP-Gefährdung als Ergänzung zur Serologie*

Gebiete, in denen KSP in den letzten 12 Monaten nicht aufgetreten ist, können als risikofrei eingeschätzt werden. Alle schweinehaltenden Betriebe, für die eine Erregerfreiheit aufgrund des serologischen Status zertifiziert wird, können frei handeln. Eventuell kann zur exakten Einschätzung der epidemiologischen Situation eine zielorientierte Untersuchung durchgeführt werden. Vor allem klinisch auffällige Tiere sowie Sauen, die verferkelt haben bzw. Frühgeburten hatten, sollten zielorientiert mittels RT-PCR untersucht werden.

b) Untersuchungen mittels RT-PCR im Rahmen von Handelsuntersuchungen in Gebieten mit geringer KSP-Gefährdung

Bei folgenden Betrieben besteht ein geringes KSP-Risiko:

- Betriebe, die außerhalb eines 1000-Meter-Radius um einen Seuchenherd liegen,
- Betriebe, die ein geschlossenes System haben und in einer Region liegen, in der nachweislich die Wildschweine mit KSP-Virus infiziert sind,
- Betriebe, die kein geschlossenes System haben, aber an eine Region angrenzen, in der nachweislich die Wildschweine mit KSP-Virus infiziert sind,
- Betriebe, die Freilandhaltung betreiben und nicht in einer Region liegen, wo nachweislich die Wildschweine mit KSP-Virus infiziert sind,
- Betriebe, die Schweine aus einem Betrieb mit hohem KSP-Risiko erhalten haben bzw. direkten Kontakt zu solch einem Betrieb hatten (z. B. Fahrzeug- oder Personenkontakt).

Um in diesen Betrieben die KSP-Freiheit zu bestätigen, sind stichprobenartig Blutproben für die Serologie und die PCR-Untersuchung zu entnehmen. Die Stichprobenuntersuchung betrifft in erster Linie Schweine mit Krankheitssymptomen, bei denen eine Infektion mit KSP-Virus nicht ausgeschlossen werden kann, sowie andere Schweine, bei denen der Verdacht besteht, dass sie sich angesteckt haben könnten.

Die Untersuchungen sollten in regelmäßigen Abständen (z. B. alle sechs Monate) sowie im Verdachtsfall stattfinden. Unabhängig davon sind RT-PCR-Untersuchungen durchzuführen, wenn beabsichtigt wird, Schweine aus dem Betrieb zu verbringen (z. B. zur Schlachtung oder in einen anderen Betrieb). Es sind 24 Stunden vor dem Verbringen mindestens so viele Schweine zu untersuchen, dass in diesen Untereinheiten mit einer Nachweissicherheit von 95 % eine Prävalenz von 5 % festgestellt werden kann.

c) Untersuchungen mittels RT-PCR im Rahmen von Handelsuntersuchungen in Gebieten mit hoher KSP-Gefährdung

Bei folgenden Betrieben besteht ein hohes KSP-Risiko:

- Betriebe, die innerhalb einer schweinedichten Region im 1000-Meter-Radius um einen Seuchenherd liegen,
- Betriebe, die Kontakt zu einem Seuchenherd hatten,
- Betriebe, die Speiseabfälle verfüttern,

- Betriebe, die kein geschlossenes System (mit eigener Nachzucht) haben und in einer Region liegen, in der nachweislich die Wildschweine mit KSP-Virus infiziert sind,
- Betriebe, die Freilandhaltung betreiben und in einer Region liegen, in der nachweislich die Wildschweine mit KSP-Virus infiziert sind.

Um in diesen Betrieben die Erregerfreiheit bestätigen zu können und um zusätzliche epidemiologische Informationen einzuholen, sind stichprobenartig Blutproben für die RT-PCR-Untersuchung zu entnehmen. Die Stichprobenuntersuchung betrifft in erster Linie Schweine mit Krankheitssymptomen, bei denen eine Infektion mit KSP-Virus nicht ausgeschlossen werden kann, sowie andere Schweine, die möglicherweise mit KSP-virusinfizierten oder KSP-verdächtigen Schweinen in Berührung gekommen sind oder bei denen der Verdacht besteht, dass sie sich durch andere Quellen angesteckt haben könnten.

Darüber hinaus müssen aus jeder einzelnen Untereinheit des Betriebes Schweine nach dem Zufallsprinzip beprobt werden. Dabei sind mindestens so viele Proben zu entnehmen, dass in jeder der betreffenden Untereinheiten mit einer Nachweissicherheit von 95 % eine Prävalenz von 2 % festgestellt werden kann, außer im Falle von Zuchtsauen, bei denen mindestens so viele Sauen zu untersuchen sind, dass mit einer Nachweissicherheit von 95 % eine Prävalenz von 1 % festgestellt werden kann. In Besamungsstationen sollten ausnahmslos alle Eber untersucht werden.

Die Untersuchungen sollten alle vier Monate sowie im Verdachtsfall stattfinden. Unabhängig davon sind PCR-Untersuchungen durchzuführen, wenn beabsichtigt wird, Schweine aus dem Betrieb zu verbringen (z. B. zur Schlachtung oder in einen anderen Betrieb). Es sind 24 Stunden vor dem Verbringen mindestens so viele Schweine zu untersuchen, dass in diesen Untereinheiten mit einer Nachweissicherheit von 95 % eine Prävalenz von 2 % festgestellt werden kann, außer im Falle von Zuchttieren, bei denen alle zu verbringenden Tiere zu untersuchen sind.

8 Offene Fragen und weiterer Forschungsbedarf

Die hier vorgestellte Vorgehensweise kann nur der Anfang eines Umdenkprozesses in der Seuchenbekämpfung der KSP sein, da eine Vielzahl von Detailfragen noch geklärt werden muss. Insbesondere zwei große Komplexe sind zu beachten: erstens die methodischen und technischen Fragen, die direkt die RT-PCR als diagnostische Methode betreffen, und zweitens die Fragen, die das Bekämpfungsmodell betreffen.

Die RT-PCR betreffen insbesondere die Fragen nach der diagnostischen Sicherheit des Systems. Da die RT-PCR eine extrem sensitive Methode ist, können Kontaminationen zu falschen Ergebnissen führen. Modalitäten zur Abklärung unklarer bzw. zweifelhafter PCR-Befunde müssen erarbeitet werden. Des Weiteren ist das Problem der Automatisierbarkeit der RT-PCR nicht endgültig geklärt. Neue Automaten, die vermehrt kommerziell angeboten werden, sind für den gewünschten Einsatz noch nicht getestet und validiert. Ein weiterer wichtiger, noch zu klärender Punkt ist die Größe der Probenpools. In der durchgeführten Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass 10 Proben gepoolt werden können, ohne ein unververtretbares

diagnostisches Risiko einzugehen. Das Potential der RT-PCR ist allerdings viel größer, so dass eventuell auch größere Probenpools gebildet werden können. Dieses wiederum ist von den eingesetzten Pipettierautomaten sowie von der Beprobungsstrategie in den Herden abhängig. Um die PCR-Untersuchungen rentabel zu machen, müssten Vorschläge unterbreitet werden, die nicht nur von der Bestandsgröße oder respektiven Probenanzahl, sondern auch von bestimmten konkreten Seuchenszenarien determiniert werden.

In tierexperimentellen Studien muss noch geklärt werden, in welchen Organen bzw. Geweben und zu welchen Infektionszeitpunkten das KSP-Virus mittels RT-PCR sicher nachgewiesen werden kann. Diese Studien sind sowohl mit Feldvirus als auch mit Impfvirus durchzuführen.

Was das Bekämpfungsmodell als solches betrifft, gilt es noch zu klären, unter welchen Umständen die KSP-(Marker)Impfung als zusätzliche Bekämpfungsmethode in die Bekämpfungsstrategie eingebunden werden kann. Insbesondere sind die neu entwickelten Markerimpfstoffe und Marker-ELISA in diesem Kontext zu diskutieren. Es wäre denkbar, dass in Betrieben mit hohem KSP-Risiko parallel zu einer RT-PCR-Überwachung die Impfung eingesetzt werden kann. Eine Feinabstimmung der RT-PCR-Untersuchungen mit den anderen Untersuchungsmethoden müsste ebenfalls vorgenommen werden. Nicht zuletzt wäre zu überlegen, inwiefern dieses Bekämpfungsmodell auch auf andere Seuchen übertragen werden kann.

9 Zusammenfassung

Schweinepest-Überwachungsprogramm für Schweine in Freilandhaltung in schweinepestgefährdeten Gebieten - ein präventives Tiergesundheitskonzept zur Überwachung der Klassischen Schweinepest

Ziel des Forschungsprojektes war es, ein auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), einem modernen diagnostischen Verfahren, beruhendes Überwachungsprogramm für Schweinepest zu erarbeiten, das ethisch vertretbar sowie sicherer, effektiver und kostengünstiger sein soll als die zur Zeit praktizierten Überwachungsprogramme. Das Programm soll als ein präventives Tiergesundheitskonzept die Möglichkeiten der ökologischen und konventionellen Schweinehaltung verbessern und das Infektionsrisiko allgemein minimieren.

Es wurde eine schweinepestspezifische PCR für die Diagnostik am lebenden Tier etabliert, die das Potential besitzt, die konventionellen diagnostischen Verfahren abzulösen. Die Methode eröffnet neue diagnostische Möglichkeiten, die einen Strategiewechsel in der Bekämpfung und Überwachung der Schweinepest ermöglicht. Eine Bekämpfungsstrategie wurde vorgeschlagen, die auf dem Erregernachweis mittels PCR fußt. Im Zentrum dieser Philosophie steht der Gedanke, dass die Seuchenfreiheit zukünftig anhand von Erregerfreiheit statt Antikörperfreiheit definiert werden soll. Die Erregerfreiheit kann mittels PCR überwacht und zertifiziert werden. Die Vorteile des Verfahrens können wie folgt zusammengefasst werden:

- Eine erweiterte Bekämpfungsstrategie, die den direkten Erregernachweis mittels RT-PCR nutzt, führt zu keinem höheren Seuchenrisiko als die jetzige Strategie.
- Impfmaßnahmen wären als zusätzliches Bekämpfungsmittel durchführbar und sollten als wichtiger Bestandteil integriert werden.
- Es würden Herden gemäßregelt werden, in denen KSP-Virus nachgewiesen wurde. Das Keulen eines Großteils der Tiere würde entfallen.
- Zertifizierte Erregerfreiheit nach RT-PCR-Untersuchung würde das Schlachten der Schweine und den freien Handel mit Schweinefleisch ermöglichen, unabhängig von der allgemeinen KSP-Situation im Land.
- Serologische Nachweisverfahren können bei einer Nichtimpfpolitik oder einer Impfstrategie mit Markerimpfstoffen weiterhin eingesetzt werden.

Abhängig von der allgemeinen Seuchensituation und von der Art des Betriebes wurden für die praktische Umsetzung des Bekämpfungsverfahrens unterschiedliche Modelle entworfen.

10 Summary

A classical swine fever surveillance programme for outdoor pigs in endemic regions – a preventive animal health concept for the surveillance of classical swine fever

The aim of the project was to establish a new surveillance programme for classical swine fever (CSF) based on the polymerase chain reaction (PCR), a novel diagnostic technique. The programme was to be ethically justifiable as well as secure, efficient and cheaper than the presently applied surveillance programmes. As a preventive animal health concept it was to improve the possibilities of ecological as well as those of conventional pig production and to minimize the general risk of infection.

A CSF specific PCR was developed which has the potential to replace the conventional diagnostic methods. The method permits novel diagnostic approaches which might change the present strategy for surveillance and eradication of CSF. A new control strategy has been proposed which is based on the direct detection of the CSF virus by using the PCR method. The central idea of this philosophy is to define freedom from the disease as freedom from CSF virus instead of freedom from CSF antibodies. Freedom from the virus can be controlled and certified by PCR. The advantages of such a system would be the following:

- Compared with the current strategy there would be no higher risk of a spread of CSF, since the sensitivity and specificity of the PCR are equal to those of the conventional methods.
- Vaccination can be applied as additional control measure and should be an integral part of the concept.
- Only herds where CSF virus has been detected would be culled. Thus, culling of the majority of the animals could be avoided.
- Certified freedom from the virus based on PCR testing would permit the trade with pigs and pig products independently of the CSF situation in the country or region.
- In case of a non-vaccination strategy or in case of a vaccination with marker vaccines serological detection methods can be applied additionally.

Depending on the general disease situation or on the profile of the herds different models for the practical implementation of the surveillance programme have been developed.

11 Literatur

Barlic-Maganja D., Grom J. 2001: Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridisation assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses. *J Virol Methods*. 95(1-2):101-10.

Carbrey, E., A. 1988: Diagnostic procedures. In: B. Liess (ed), *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston.

Europäische Kommission: Richtlinie 2001/89/EC des Rates über Maßnahmen der Gemeinschaft zur Bekämpfung der klassischen Schweinepest vom 23. Oktober 2001.

Europäische Kommission: Entscheidung der Kommission (2002/106/EG) vom 1. Feb. 2002 zur Genehmigung eines Diagnosehandbuchs mit Diagnosemethoden, Probenahmeverfahren und Kriterien für die Auswertung von Laboruntersuchungen zur Bestätigung der Klassischen Schweinepest.

Fritzemeier, J., Teuffert, J., Greiser-Wilke, I., Staubach, C., Schlüter, H., Moennig, V. 2000: Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet. Microbiol.* 77, 29-41.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G, Watson, R. 1993: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11(9):1026-30.

Horst; H. S., Meuwissen, M.P.M., Smak, J.A., Van de Meijs, C.C.J.M. 1999: The involvement of the agriculture industry and government in animal disease emergencies and the funding of compensation in Western Europe. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 18, 30-37.

Hyndman, L., Vilcek, S., Conner, J., Nettleton, P.F. 1998: A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *J. Virol. Methods* Mar; 71(1): 69-76.

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

Liess, B. 1987: Pathogenesis and Epidemiology of Hog Cholera: *Ann. Rech. Vet.* 18, 139-145.

Paton, D.J., McGoldrick, A., Belak, S., Mittelholzer, C., Koenen, F., Vanderhallen, H., Biagetti, M., De Mia, G.M., Stadejek, T., Hofmann, M.A., Thuer, B. 2000: Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol.* 73 (2-3):159-74.

Paton, D.J., McGoldrick, A., Bensaude, E., Belak, S., Mittelholzer, C., Koenen, F., Vanderhallen, H., Greiser-Wilke, I., Scheibner, H., Stadejek, T., Hofmann, M., Thuer,

B. 2000: Classical swine fever virus: a second ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol.* 77 (1-2):71-81.

Risatti, G.R., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Borca, M.V. 2003: Rapid detection of classical swine fever virus by a portable Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 500-505.

Sandvik, T., Paton, D.J., Lowings, P.J. 1997: Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions. *J Virol Methods.*64(1):43-56.

Teuffert, J., Schlüter, H., Kramer, M. 1997: Europäische Scheinepest. Übersicht zur internationalen (Europa) und nationalen Schweinepestsituation – ermittelte Einschleppungsursachen und Verschleppungsrisiken. *Deutsches Tierärzteblatt*,11, 1078-1080.

Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J. 1994: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol.* 136(3-4):309-23.

12 Anhang

Auswertung – FRAGEBOGEN

Entwicklung einer real-time RT-PCR für die Massendiagnostik der KSP im Routinebetrieb

Anzahl ausgewerteter Fragebögen: 21

- 1) Würden Sie einen "ready to use" RT-PCR-Kit für die Pestivirusdiagnostik befürworten?
21 Ja **0** Nein

- 2) Sollte der RT-PCR-Kit KSP- oder Panpesti-spezifisch sein?
6 KSP-spezifisch **4** Panpesti-spezifisch **11** beides

- 3) Welche Anforderungen sollte die RT-PCR erfüllen? Bitte wie folgt beurteilen:
 1 = unwichtig; 5= sehr wichtig

	1	2	3	4	5
Qualitativer Nachweis Virusgenom					21
Quantitativer Nachweis Virusgenom	5	9	5		2
Sensitivität KSP			3	10	8
Sensitivität Panpesti	1	1	4	4	11
Spezifität KSP			1		20
Spezifität Panpesti	1	1	2	3	14
Neg. Kontrolle für RNA-Extraktion		3	7		11
Neg. Kontrolle für RT-PCR		1	3	1	16
Pos. Kontrolle für RNA-Extraktion	1	1	4	2	13
Pos. Kontrolle für RT-PCR	1		3	2	15
Kontrolle nur für Reverse Transkription	2	7	8	1	2
One-tube RT-PCR			3	7	11
Two-tube RT-PCR	6	8	4	1	1
RNA-Extraktion mit im Kit integriert	5	2	9	4	
Möglichkeit des Poolens von Proben	1		6	10	4
Einsatz Automatisierung	1	4	7	2	7
Robustheit des Kits			2	3	15
Sonstiges: -Geräteunabhängigkeit				1	
-Amplifikationskontrolle					1
-Anleitung in dt. Sprache					1
-Diskriminierung zwischen geimpften und befallenen Tieren					1

- 4) Welcher Bereich des Virusgenoms sollte amplifiziert werden?
5 5'NTR **0** Erns **2** E2 **0** NS5B **0** 3'NTR **17** egal
 2 x Note: Differenzierung zwischen Impf- und Feldvirus

- 5) Welches Untersuchungsmaterial würden Sie bevorzugen bzw. würde am besten in Ihr Untersuchungsschema passen? Bitte wie folgt beurteilen: 1 = nicht geeignet; 5 = am besten geeignet.

	1	2	3	4	5
Vollblut EDTA		2	2	6	9
Vollblut Heparin	8	4	2	3	2
Plasma EDTA	2	3	3	4	6
Plasma Heparin	8	4	3	2	1

Serum	1	3	6	2	8
Leukozytenfraktion	3	2	4	3	7
Organmaterial	1		2	3	14
Organanreicherung	5		8	1	8
Blutkuchenanreicherung	6	4	6	2	1
Sonstiges Material: <i>.Bauchhöhlenflüssigkeit</i>			1		

- 6) Können Sie sich vorstellen, die real-time RT-PCR in der KSP-Massendiagnostik einzusetzen?

16 Ja **4** Nein 3 X Note: -Schwierig für Massendiagnostik da gut eingearbeitetes Personal notwendig.
- Ja, wenn Kosten =< AG-ELISA.
- kein Gerät

- 7) Würden Sie einen real-time RT-PCR Kit verwenden, der es erlaubt in einem RT-PCR-Ansatz mehr als ein Template zu amplifizieren und zu spezifizieren (multiplex real time RT-PCR)?

17 Ja **4** Nein

Wenn ja, wie sollte die multiplex real-time RT-PCR aufgebaut sein? Bitte wie folgt beurteilen:
1 = unwichtig; 5= sehr wichtig

	1	2	3	4	5
Pos. Kontrolle + KSP-spezif. RT-PCR	1	1	3	2	9
Pos. Kontrolle + Panpesti-spezif. RT-PCR	2	3	5	3	3
KSP-spezif. + Panpesti-spezif. RT-PCR	2	5	2	4	4
Pos. Kontrolle + KSP-spezif. + Panpesti-spezif. RT-PCR	2	1	2	7	5

- 8) Mit welchen Volumina würden Sie die real-time RT-PCR durchführen wollen?

5 25µl **8** 50µl **3** 100µl **6** 20µl **1** 12,5µl **1** 15 µl

- 9) Falls die RNA-Extraktion nicht Bestandteil des Kits sein soll, welche RNA-Extraktion würden Sie selber durchführen?

1 auf monophasische Lösungen basierende Prozedur (z. B. Trizol)
20 Silica- oder Glas-Adsorptionskits (z. B. RNeasy Kit, Qiagen, High Pure Viral Kit, Roche)
2 Anionenaustausch-Chromatografie (z. B. Qiagen Anion-Exchange Resin)
2 Affinitäts-Reinigungskits (z. B. magnetic beads)
0 Gelfiltrationssäulen (z. B. Sephadex G25 oder G50)

1x Note: Die, die am Besten ist, wir sind flexibel.

- 10) Wenn Sie das Poolen von Proben befürworten, aus wieviel Proben sollte der Pool bestehen?

8 1 bis 5 **6** 6-10 **3** 11-20 **1** 21-30 **0** 31-50

3x Note: -Muss in Sachen Sensitivität verantwortbar sein
-abhängig von Sensitivität
-abhängig von der Anzahl zu erwartender positiver Proben

- 11) Sollte ein alternativer zugelassener Kit auch als Variante für die einfache RT-PCR (nicht real-time RT-PCR) verfügbar sein?

18 ja **2** nein

2x Note: -Nicht unbedingt nötig.
-Zusätzlich über anderes Primerpaar.

- 12) Falls Sie bereits ein real-time PCR Gerät besitzen, ist die Datenerfassung mit mehr als nur eine Wellenlänge möglich?

16 ja **0** nein

Tabelle 1: Untersuchung des real-time RT-PCR-Systems hinsichtlich Spezifität anhand von 36 unterschiedlichen KSP-Viren, 9 BD-Viren und 45 BVD-Viren

Virus	Genotyp	Untersuchte Isolate	Real-time RT-PCR	
			A	B
KSP-Virus	1.1	7	+++	+++
	1.2	4	+++	+++
	2.1	6	+++	+++
	2.2	5	+++	+++
	2.3	12	+++	+++
	3.1	1	+++	+++
	3.4	1	+++	++
		Σ 36		
BD-Virus		9	-	-
BVD-Virus	I	22	-	-
	II	19	-	-
	atypisch	4	-	-
		Σ 45		

Das Virus der Klassischen Schweinepest (KSP-Virus), das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVD-Virus) und das Border Disease Virus (BD-Virus) sind verwandte Viren des Genus Pestivirus. Die RT-PCR erkennt korrekterweise nur die KSP-Viren.

Tabelle 2: In vitro Sensitivitätsvergleich zwischen RT-PCR und Virusisolierung

Virus- verdünnung	KSP-Virusstamm Alfort (Genotyp 1.1)		KSP-Virusstamm Uelzen (Genotyp 2.3)	
	Virusisolierung	RT-PCR	Virusisolierung	RT-PCR
10 ⁻¹	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	-	+
10 ⁻⁶	+	-	-	-
10 ⁻⁷	-	-	-	-

Die Sensitivität der RT-PCR gegenüber der Virusisolierung ist beim KSP-Virusstamm Alfort (Laborstamm) um eine 10er Potenz niedriger und bei dem Feldstamm Uelzen um eine 10er Potenz höher.

Tabelle 3: Vergleichende Untersuchungen mittels RT-PCR, Virusisolierung und Antigen-ELISA von Blutproben eines an Schweinepest transient erkrankten Schweins

Tage nach Infektion	Virus-isolierung	Antigen ELISA	Antikörper-nachweis	Klinik	RT-PCR
0	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+
5	+	-	-	-	+
7	+	-	-	-	+
10	+	-	-	+	+
12	-	+	-	-	+
14	-	-	+	-	+
17	-	-	+	-	+
19	-	-	+	-	-
21	-	-	+	-	-
25	-	-	+	-	-

Mittels Virusisolierung wurde das Tier an den Tagen 5, 7 und 10 als positiv erkannt. Im Antigen-ELISA reagierten die Proben nur am Tag 12 positiv. Ab Tag 14 wurden Antikörper im Blut nachgewiesen. Klinische Symptome (Fieber) wurden nur um den Tag 10 beobachtet. Mit der RT-PCR wurden die Proben von Tag drei bis Tag 17 positiv diagnostiziert.

Tabelle 4: Vergleichende Untersuchungen mittels RT-PCR, Virusisolierung und Antigen- ELISA von Blutproben eines an Schweinepest letal erkrankten Schweins

Tage nach Infektion	Virus-isolierung	Antigen ELISA	Antikörper-nachweis	Klinik	RT-PCR
0	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+
5	+	-	-	-	+
7	+	-	-	+	+
10	+	+	-	+	+
12	+	+	-	+	+
14	+	+	+	+	+
17	+	-	+	+	+
19	+	-	+	+	+
21	+	-	+	+	+
25	-	-	+	+	+
31	-	-	+	+	+

Mittels Virusisolierung wurde das Tier an den Tagen 5 bis 21 als positiv erkannt. Im Antigen-ELISA reagierten die Proben an den Tagen 10 bis 14 positiv. Ab Tag 14 wurden Antikörper im Blut nachgewiesen. Klinische Symptome (Fieber) wurden ab dem Tag 10 beobachtet. Mit der RT-PCR wurden die Proben ab dem Tag 3 als positiv diagnostiziert.

Tabelle 5: Vergleichende Untersuchungen von Serum und Vollblut in der RT-PCR eines an Schweinepest transient erkrankten Schweins

Tage nach Infektion	Virus-isolierung	Antikörper-nachweis	RT-PCR	
			Vollblut	Serum
0	-	-	-	-
3	-	-	+	+
5	+	-	+	+
7	+	-	+	+
10	+	-	+	+
12	-	-	+	+
14	-	+	+	-
17	-	+	+	-
19	-	+	-	-
21	-	+	-	-
25	-	+	-	-

Mittels Virusisolierung wurde das Tier an den Tagen 5, 7 und 10 als positiv erkannt. Die Vollblutproben reagierten positiv in der RT-PCR zwischen dem 3. und 17. Tag nach Infektion, die Serumproben waren von Tag 3 bis Tag 12 positiv.

Abb. 1: Die KSP-Seuchensituation in Deutschland im Jahre 2002. Es wurden 11 Seuchenausbrüche bei Hausschweinen (roter Punkt) und 451 bei Wildschweinen (blauer Punkt) gemeldet.

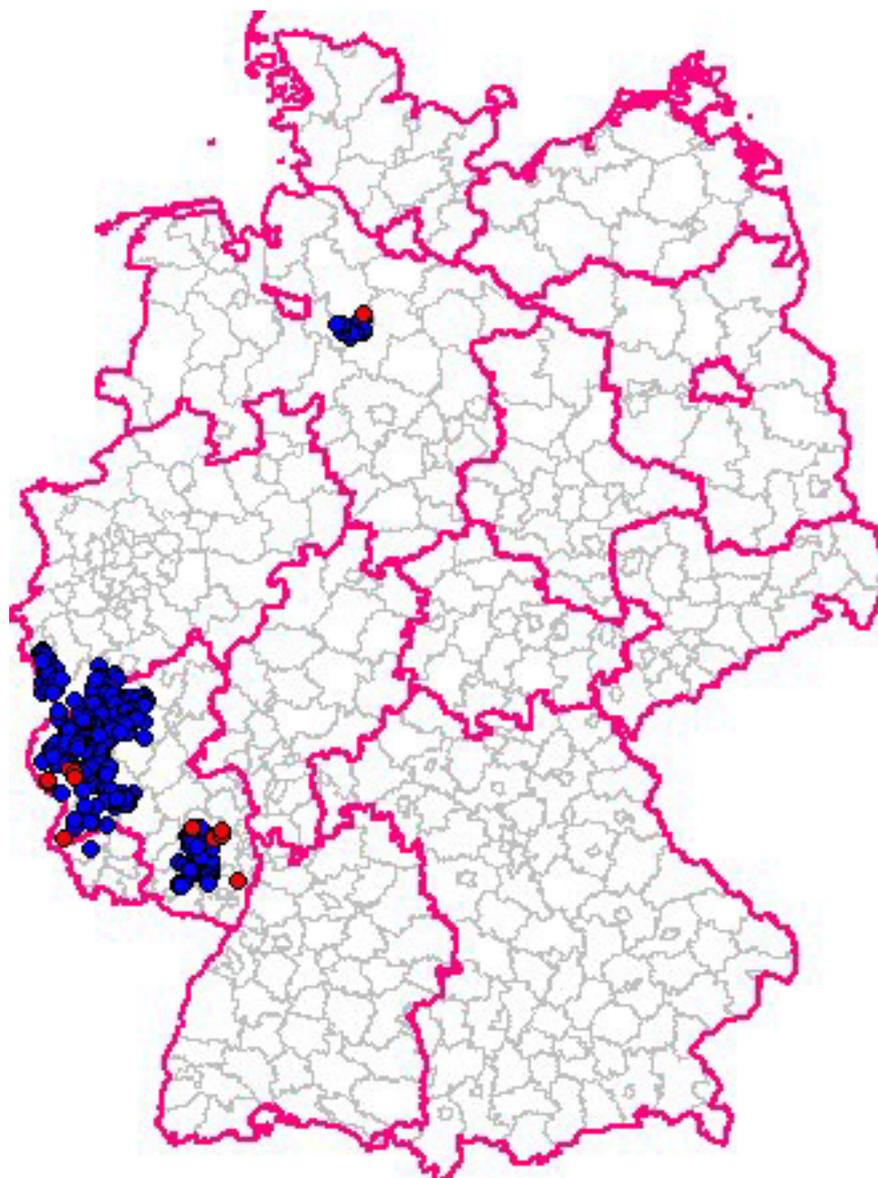
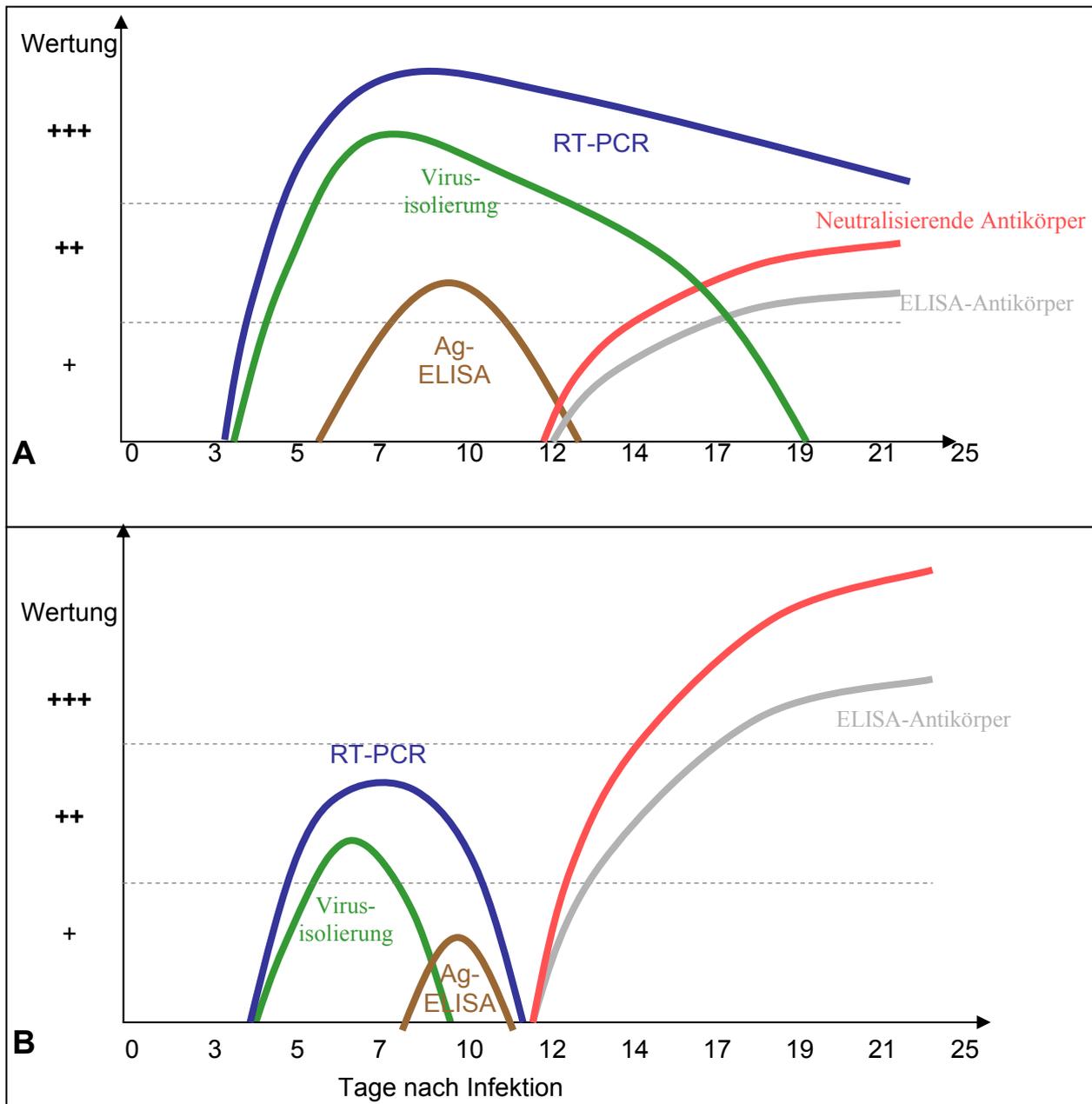


Abb. 2: Schematische Darstellung der direkten und indirekten Nachweismethoden für KSP bei akutem (A) und transientem (B) Krankheitsverlauf.



Mittels RT-PCR wird im Beispiel A das Tier zwischen Tag 3 und Tag 25 als positiv diagnostiziert und im Beispiel B zwischen Tag 4 und Tag 11. Sowohl mit der Virusisolierung als auch mit dem Antigen-ELISA ist das Nachweisintervall in beiden Beispielen wesentlich kürzer.