

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Afrikanische Schweinepest – Charakterisierung aktueller Isolate sowie
Entwicklung und Testung praxistauglicher Überwachungsoptionen**

von Jana Pietschmann
aus Halle (Saale)
München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am:

Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Instituts,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems

Mentor: Prof. Dr. Martin Beer

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Tag der Promotion: 18.07.2015

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeiten sind in dieser Dissertationsschrift enthalten:

Pietschmann J, Guinat C, Beer M, Pronin V, Tauscher K, Petrov A, Keil G, Blome S: „Course and transmission characteristics of oral low dose infection of domestic pigs and European wild boar with a Caucasian African swine fever virus isolate“, akzeptiert von *Archives of Virology* 2015

Tauscher K, Pietschmann J, Wernike K, Teifke J P, Beer M, Blome S: „Zur Situation der Afrikanischen Schweinepest und der biologischen Charakterisierung aktueller Virusisolate / Clinical signs and pathology of recent African swine fever virus isolates“, erscheint in der *Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift* 2015, 128 (6/7)

Petrov A, Schotte U, Pietschmann J, Dräger C, Beer M, Anheyer-Behmenburg H, Goller KV, Blome S.: „Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar.“, erschienen in *Veterinary Microbiology* 2014; 173(3-4): 360-5.

Blome S, Goller KV, Petrov A, Dräger C, Pietschmann J, Beer M: „Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar - Extension towards African swine fever virus antibody detection.“, erschienen in *Veterinary Microbiology* 2014; 174(3-4): 607-608.

Weitere Arbeiten, die nicht in die Dissertationsschrift eingehen:

Petrov A, Blohm U, Beer M, Pietschmann J, Blome S: „Comparative analyses of host responses upon infection with moderately virulent classical swine fever virus in domestic pigs and wild boar.“, erschienen im *Virology Journal* 2014, 11:134

Feliziani F, Blome S, Petrini S, Giammarioli M, Iscaro C, Severi G, Convito L, Pietschmann J, Beer M, De Mia GM.: “First assessment of classical swine fever marker vaccine candidate CP7_E2alf for oral immunization of wild boar under field conditions.”, erschienen in *Vaccine* 2014, 32(18):2050-5

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT ZUR AFRIKANISCHEN SCHWEINEPEST... 2	
2.1	Virusstruktur	2
2.2	Pathogenese	3
2.3	Klinik und Pathologie	4
2.4	Epidemiologie.....	6
2.5	Verbreitung	8
2.6	Labordiagnostik und Bekämpfungsstrategien	12
3	Ziele der Arbeit	14
4	Resultate	15
4.1	Biologische Charakterisierung und Pathogenese	16
4.1.1	Course and transmission characteristics of oral low dose infection of domestic pigs and European wild boar with a Caucasian African swine fever virus isolate	16
4.1.2	Zur Situation der Afrikanischen Schweinepest und der biologischen Charakterisierung aktueller Virusisolate.....	38
4.2	Überwachungs- und Bekämpfungsstrategien	56
4.2.1	Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar	56
4.2.2	Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar – Extension towards African swine fever virus antibody detection.....	67
5	Diskussion	71
5.1	Biologische Charakterisierung aktueller Isolate.....	71
5.1.1	Untersuchungen zum Einfluss der Infektionsdosis.....	71
5.1.2	Vergleichende Untersuchung zur Klinik und Pathologie aktueller ASPV-Isolate.....	73
5.2	Entwicklung eines vereinfachten Beprobungsverfahrens für Fallwild	74
5.3	Schlussfolgerungen.....	75
6	Zusammenfassung.....	76

7	Summary	77
8	Referenzen.....	78
9	Abkürzungsverzeichnis	87
10	Abbildungsverzeichnis	88
11	Danksagungen	89

1 EINLEITUNG

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) gehört zu den weltweit gefürchtetsten Infektionskrankheiten des Schweins und ist bei der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE, franz. *Office International des Épizooties*) anzeigepflichtig. Verursacht wird die in der Regel tödlich verlaufende Erkrankung durch das Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASPV), welches zur Gattung *Asfivirus* innerhalb der Familie *Asfarviridae* gehört. Empfänglich für das ASPV sind nur Mitglieder der Familie der echten Schweine (*Suidae*) sowie Lederzecken der Gattung *Ornithodoros*. Die afrikanischen Wildschweinearten (Warzenschweine, Buschschweine und Riesenwaldschwein) sind die natürlichen Wirte des Virus, wohingegen die Lederzecken als Vektoren fungieren. Ursprünglich war die ASP nur in Afrika beheimatet. Seit den 1950er Jahren kam es allerdings auch zu Ausbrüchen in Europa und Amerika. Auf der italienischen Insel Sardinien ist die ASP seit mehr als 30 Jahren endemisch und auf der iberischen Halbinsel konnte die Erkrankung erst in den späten 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wieder getilgt werden. Der letzte Neueintrag auf den eurasischen Kontinent fand im Jahr 2007 im Trans-Kaukasus statt. Von diesem Geschehen ausgehend, kam es seit 2014 zu Ausbrüchen in den baltischen Staaten und Polen.

Für die Optimierung von Bekämpfungsstrategien, die derzeit ohne Impfstoff auskommen müssen, ist die Kenntnis der Epidemiologie und Biologie der Erkrankung von großer Bedeutung. Für die ASP wird seit einigen Jahren ein dosisabhängiger Infektionsverlauf diskutiert. Mittels eines gut charakterisierten Isolats aus Armenien wurde diese Fragestellung in Haus- und Wildschweinen untersucht. Insbesondere ging es um die Frage, ob niedrige Infektionsdosen die Gefahr von chronischen oder persistierenden Infektionen erhöht.

Da gezeigt werden konnte, dass die aktuellen ASPV-Isolate eine hohe Virulenz besitzen, kommt der Untersuchung von Fallwild für die Früherkennung eine herausragende Rolle zu. Für diesen Zweck werden zum Beispiel Blut- und Organproben von Fallwild entnommen. Mit dem Ziel die Bereitschaft der Jägerschaft zu fördern und die Probenentnahme sowie den anschließenden Versand zu vereinfachen, wurden daher drei unterschiedliche Tupfersysteme untersucht und für den Einsatz in der Praxis validiert.

2 LITERATURÜBERSICHT ZUR AFRIKANISCHEN SCHWEINEPEST

2.1 Virusstruktur

Bei dem Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASPV) handelt es sich um ein behülltes doppelsträngiges DNS-Virus (dsDNS). Bei Haus- und Wildschweinen löst das Virus die gleichnamige Krankheit, die Afrikanische Schweinepest (ASP), aus. Es ist das bisher einzige Mitglied der Gattung *Asfivirus* in der Familie der *Asfarviridae* (*african swine fever and related viruses*) (Takamatsu, 2011, Anonymous, 2012).

Das ASPV ist das einzige bekannte Arbovirus (*arthropod borne virus*), welches ein DNS-Genom besitzt (Takamatsu, 2011). Das lineare doppelsträngige Genom hat eine Länge von 170 bis 193 kbp (Chapman et al., 2008, Rodriguez et al., 1994). In Abhängigkeit vom Virusstamm kodiert das Genom für 150 bis 167 offene Leserahmen (ORFs, engl. *open reading frames*) (de Villiers, 2010, Chapman et al., 2008). Zudem werden fünf Multigenfamilien beschrieben (Gonzalez et al., 1990). Diese liegen im Genom nahe der Termini und weisen eine sehr hohe Variabilität zwischen den einzelnen Isolaten auf (Chapman et al., 2008).

Das Virus besitzt mehrere Hüllen (Abbildung 1). Die innerste Schicht bildet eine 30 nm dicke Proteinhülle, die als Kernhülle (engl. *core shell*) bezeichnet wird (Salas and Andrés, 2012). Darauf folgen die innere Hülle (engl. *inner envelope*) und das Kapsid. Das Kapsid besteht aus etwa 2.000 Kapsomeren (Carrascosa et al., 1984). Die Hauptkomponente der Kapsomere bildet das Protein 72 (p 72) (García-Escudero R, 1998), welches für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle benötigt wird (Chapman et al., 2008). Ein weiteres hier verankertes Protein ist das pE120R. Es ist für den Transport der fertigen Viruspartikel zur Zellmembran verantwortlich (Andrés, 2001). Die äußere Hülle (engl. *outer envelope*) entsteht durch Knospung (engl. *budding*) an der Zellmembran und ist nur bei extrazellulären Virionen vorhanden (Brookes et al., 1996, Breese and CJ., 1966) (Abbildung 1). Bisher wurden 54 Strukturproteine auf der äußeren Hülle beschrieben (Esteves et al., 1986). Darunter das Protein 12 (p 12), welches *in vitro* die Anlagerung von Erythrozyten an infizierte Makrophagen vermittelt (Malmquist, 1960). Diese Bindung wird durch ein Homologon zum tierischen CD2 (Goatley and Dixon, 2011) stabilisiert. In der Diagnostik wird dieses HämadSORPTIONSphänomen regelmäßig genutzt.

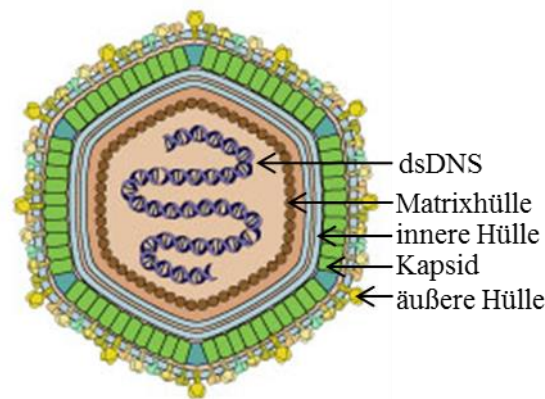


Abbildung 1: Aufbau des Afrikanischen Schweinepest Virus (Bioinformatics, 2008).

2.2 Pathogenese

Die Aufnahme des ASPV in den Wirtsorganismus erfolgt über die Tonsillen oder die dorsale Rachenschleimhaut. Von hier aus gelangt das Virus zu den Mandibular- oder Retropharyngeallymphknoten (Sánchez-Vizcaíno et al., 2009). Dort erfolgt die primäre Replikation mit anschließender Virämie. Insbesondere Virionen von hämadsorbierenden Isolaten heften sich an Erythrozyten und werden auf diese Weise durch den Körper transportiert (Quintero et al., 1986). Untersuchungen zeigten, dass das Virus auch an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut zu finden sein kann (Genovesi et al., 1988).

Die anschließende Virusreplikation erfolgt primär in den Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (PBMCs) (Gomez-Villamandos et al., 2003). Als Ursache für die darauf folgenden Läsionen gilt die Aktivierung der infizierten Monozyten und Makrophagen. Dies erfolgt unter anderem als sekretorische oder phagozytotische Aktivierung einiger Makrophagensubpopulationen. Zusätzlich kommt es zu einer Zerstörung von Monozyten. In der Folge kommt es zur Freisetzung von zellulären Komponenten, Arachidonsäuremetaboliten, Komplementfaktoren und Zytokinen (Penrith et al., 2004). Daraufhin werden weitere Monozyten aktiviert, sodass ein breites Spektrum an Mediatoren sekretiert wird. Hierzu gehören folgende proinflammatorische Zytokine: Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Murtaugh et al., 1996). Diese Zytokine sind bekannt als Auslöser der Akuten-Phase-Reaktion, der Entzündungsreaktionen, der Aktivierung von Endothelzellen und der Apoptose. Unter den genannten Faktoren scheint jedoch TNF- α eine besondere Rolle während einer ASPV-Infektion zu spielen (Gomez del Moral, 1999). Er kann sowohl eine Vasodilatation als auch eine erhöhte Gefäßpermeabilität

induzieren. Auf diesem Weg moduliert er den Zustand des Gefäßendothels. Durch diese Mechanismen entstehen wahrscheinlich die hämorrhagischen Läsionen (Gomez del Moral, 1999). Die genaue Funktionsweise ist umstritten. Während einige Studien davon ausgehen, dass die Läsionen mit der Virusreplikation in den Endothelzellen zusammenhängt (Sierra et al., 1989), wird diese Theorie von anderen Arbeitsgruppen angefochten, obwohl Endothelschäden gezeigt werden konnten (Carrasco et al., 1997, Gomez-Villamandos et al., 1995b). Weitere mögliche Ursachen der Hämorrhagien können die Freisetzung von Zytokinen durch infizierte Makrophagen (Anderson et al., 1987, Gomez-Villamandos et al., 2003, Villeda et al., 1993) oder die disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC, engl. *disseminated intravascular coagulation*) sein. Eine Folge der DIC ist die Thrombozytopenie, zu der es in der finalen Phase einer akuten ASPV-Infektion kommen kann (Villeda et al., 1993, Edwards et al., 1984, Genovesi et al., 1988, Gomez-Villamandos et al., 1995a, Blome et al., 2013, Sanchez-Cordon et al., 2008). Eine weitere Änderung des Blutbildes betrifft die Lymphozytenpopulationen. Mit ASPV infizierte Schweine zeigen oftmals eine akute Lymphopenie. Als Ursache wird eine vermehrte Apoptose der Lymphozyten angenommen (Karalova et al., 2012). Die Apoptose scheint eine Reaktion auf die von infizierten Makrophagen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine zu sein (Oura et al., 1998b, Salguero et al., 2005).

Bei der chronischen Form der ASP wird als möglicher Auslöser der Läsionen eine Autoimmunkomponente vermutet. Dabei kommt es zu einer Ablagerung von Immunkomplexen in Organen wie den Nieren, der Lunge und der Haut (Plowright et al., 1994).

2.3 Klinik und Pathologie

Eine ASPV-Infektion nur anhand von Klinik und Pathologie zu diagnostizieren ist äußerst schwierig beziehungsweise unmöglich. Dennoch ist es von großer Bedeutung die entsprechenden Anzeichen zu kennen und zu erkennen. In Abhängigkeit von der Virulenz kann die Krankheit perakut, akut, subakut oder chronisch verlaufen (OIE, 2012, Sanchez-Vizcaino et al., 2014, OIE, 2013a). Die Inkubationszeit beträgt, ebenfalls in Abhängigkeit von der Virulenz des Isolats, zwischen drei und 14 Tagen.

Perakute Verläufe mit plötzlichen Todesfällen werden insbesondere nach Infektion mit hochvirulenten ASPV-Stämmen beobachtet (OIE, 2012).

Wahrscheinlicher ist bei hoch und moderat virulenten Stämmen ein akuter Krankheitsverlauf. Dieser manifestiert sich in erster Linie in sehr hohem Fieber (über 40 °C) (Genovesi et al., 1988, Gomez-Villamandos et al., 1995b, Rodriguez et al., 1996). Diese hohe Körpertemperatur der Schweine ist oftmals das einzige klinische Anzeichen. Aufgrund des Fiebers kommt es häufig zu allgemeiner Schwäche und Inappetenz. Des Weiteren können Atembeschwerden mit blutigem Ausfluss aus den Nasenlöchern (Carrasco et al., 1996, Gabriel et al., 2011), blutige Diarrhoe, evtl. Konstipation, Vomitus und Konjunktivitis auftreten (Howey et al., 2013). Darüber hinaus werden Blutungen und Zyanosen an den Ohren und Extremitäten beschrieben (Anonymous, 2000, Sanchez-Vizcaino et al., 2014). In jedem Stadium der Trächtigkeit kann es zum Verferkeln bzw. zur Resorption der Früchte kommen (OIE, 2013a, Schlafer and Mebus, 1987). Die Mortalitäts- und Morbiditätsraten können bis zu 100 % erreichen (OIE, 2013a, Sanchez-Vizcaino et al., 2014). Der Tod tritt in der Regel ein bis sieben Tage nach dem Auftreten erster klinischer Anzeichen ein (Sanchez-Vizcaino et al., 2014, OIE, 2013a). Anhand dieser unspezifischen Klinik kommt eine Vielzahl an Differentialdiagnosen in Frage. Zu den Differentialdiagnosen gehören unter anderem die Klassische Schweinepest (KSP), das Porzine reproduktive und respiratorische Syndrom (PRRS), das Porzine Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS), die Aujeszky'sche Krankheit (AK), der Rotlauf, die Salmonellose, die Pasteurellose, oder andere Septikämieerreger, aber auch Vergiftungen mit Kumarin oder Kochsalz (Kleiboeker, 2002, OIE, 2012, OIE, 2013a, Sanchez-Vizcaino et al., 2014). Bei der Sektion fällt bei akut an ASPV verstorbenen Tieren eine stark verzögerte Blutgerinnung auf. Zusätzlich werden eine hämorrhagische Gastritis (Gabriel et al., 2011), Petechien in der Nierenrinde (Blome et al., 2013, Sanchez-Vizcaino et al., 2014) sowie hämorrhagische und vergrößerte Lymphknoten, insbesondere im Nieren- bzw. Leber-Magen-Bereich beobachtet (Sanchez-Vizcaino et al., 2014). Weitere Befunde sind Ergüsse in die Körperhöhlen und eine Splenomegalie (Gomez-Villamandos et al., 2013, Anonymous, 2000, Ekue et al., 1989, Sanchez-Vizcaino et al., 2014). Regelmäßig können Blutungen in die Gallenblasenwand und ins Gallenblasenbett beobachtet werden. Diese Blutungen sind oft mit einem Ödem der betroffenen Regionen assoziiert (Kleiboeker, 2002, OIE, 2013a).

Bei moderat virulenten Stämmen wurden außerdem subakute Verläufe beschrieben. Kennzeichnend hierfür sind wellenförmige Fieberkurven, allgemeine Schwäche der Tiere und Pneumonien (Sanchez-Vizcaino et al., 2014). In der Sektion zeigen sich den akuten Verläufen ähnliche Läsionen. Diese sind jedoch weniger deutlich ausgeprägt (Mebus, 1988, Gomez-Villamandos et al., 1995b, Rodriguez et al., 1996).

Zu chronischen Erkrankungen kann es nach Infektion mit moderat und niedrig virulenten Stämmen kommen. Diese Verlaufsform wird beim Hausschwein sehr selten beschrieben (Parker et al., 1969) und steht vor allem im Zusammenhang mit der Verwendung von attenuierten Lebendimpfstoffen (King et al., 2011, Dixon et al., 2013). Die Klinik ist noch unspezifischer als bei den zuvor beschriebenen Verläufen. Beobachtet werden Nekrosen der Haut sowie Arthritiden (Sanchez-Vizcaino et al., 2014). Häufig kommt es zu sekundären bakteriellen Infektionen (OIE, 2012).

Ferner wird berichtet, dass das ASPV eine persistierende Infektion in Schweinen auslösen kann. Stellen an denen das Virus persistiert, sind vorwiegend Lymphknoten und die Milz. Virale DNS konnte in diesen Tieren im Blut bis zu 70 Tage nach Infektion nachgewiesen werden, infektiöses Virus konnte dagegen nicht isoliert werden (de Carvalho Ferreira et al., 2012). Die epidemiologische Bedeutung dieser Ergebnisse und der sogenannte „Carrier“-Status sind noch nicht gänzlich untersucht (Arias and Sánchez-Vizcaíno, 2008).

2.4 Epidemiologie

Als Wirte dienen dem ASPV alle Mitglieder der Familie der echten Schweine (*Suidae*). Hierzu zählen die in Afrika beheimateten Warzenschweine (*Phacochoerus* spp.) (Haresnape et al., 1985, Detray, 1957, Anderson et al., 1998, Montgomery, 1921), Buschschweine (*Potamochoerus* spp.) (Luther et al., 2007, Anderson et al., 1998, Jori and Bastos, 2009, Gers et al., 2010, Oura et al., 1998a) und das Riesenwaldschwein (*Hylochoerus meinertzhageni*) (Thomson, 1985, Anderson et al., 1998, Jori and Bastos, 2009). Diese afrikanischen Arten gelten als natürliche Wirte und durchlaufen eine subklinische Infektion (Oura et al., 1998a, Jori and Bastos, 2009). Im Gegensatz dazu führt die ASPV-Infektion bei den ebenfalls zur Familie der *Suidae* gehörenden europäischen Wildschweinen (*Sus scrofa*) und den domestizierten Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*) (Montgomery, 1921) zu schweren klinischen Verläufen. Die Tiere versterben oftmals akut (Montgomery, 1921). Über die Familie der echten Schweine hinaus kann das Virus in Lederzecken der Gattung *Ornithodoros* replizieren (Costard et al., 2013, Plowright et al., 1969, Plowright et al., 1970, Haresnape and Wilkinson, 1989). Diese dienen dem ASPV als kompetente Vektoren und als Reservoir (Pini and Hurter, 1975, Wilkinson, 1986, Boinas et al., 2014). Die in Afrika beheimateten Arten (beispielsweise *O. moubata*) können das Virus sowohl über die verschiedenen Entwicklungsstadien als auch ovariell an ihre Nachkommen weitergeben (Wilkinson, 1986).

Die Art *Ornithodoros erraticus*, welche auf der iberischen Halbinsel (Portugal, Spanien) vorkommt, vermag das Virus nur über die Stadien weiterzugeben (Boinas et al., 2014).

Die potentiellen Übertragungswege zwischen den genannten Wirten sind sehr komplex und können in drei Hauptzyklen eingeteilt werden. Hierzu zählt zum einen der sylvatische Zyklus. Dieser Transmissionsweg wurde bisher nur auf dem afrikanischen Kontinent beschrieben. Diese Übertragung des ASPV findet zwischen Lederzecken der Gattung *Ornithodoros* und den afrikanischen Wildschweinearten statt. In der Regel dient das Warzenschwein als Wirt (Plowright et al., 1969, Thomson, 1985, Wilkinson, 1986, Gallardo et al., 2011). In den Erdbauten, wo die Jungtieraufzucht stattfindet, kommt es regelmäßig zu Kontakten mit *Ornithodoros* spp. Ein weiterer Zyklus ist derjenige innerhalb der Hausschweinepopulation (Arias, 2002, Sanchez-Vizcaino et al., 2012). Die Vermischung von sylvatischem Zyklus mit dem Hausschweinezyklus beschreibt die dritte Transmissionsroute (Costard et al., 2013, Costard et al., 2009). Hierbei kann es zu Kontakten zwischen *Ornithodoros* Zecken und domestizierten Hausschweinen kommen (Thomson, 1985). Dies war insbesondere bei Ausbrüchen in Spanien und Portugal der Fall. Für Sardinien, wo die ASP seit mehr als 30 Jahren endemisch ist, konnte dieses Szenario ausgeschlossen werden, da es keine Hinweise für ein Vorkommen von *Ornithodoros* spp. gibt. Hier und in weiten Teilen Europas und Russlands wird der Kontakt von europäischen Wildschweinen mit Hausschweinen in Hinterhof- und Freilandhaltungen als möglicher Transmissionsweg des ASPV vermutet (Gogin et al., 2013). Auf dem afrikanischen Kontinent werden hingegen selten Kontakte zwischen afrikanischen Wildschweinearten und Hausschweinen beobachtet (Jori and Bastos, 2009, Thomson, 1985, Wilkinson, 1986).

Über die Rolle, die *Ornithodoros* spp. in weiten Teilen Europas spielen, ist zurzeit wenig bekannt. Aus diesem Grund wird die Verbreitung von Lederzecken dieser Gattung EU-weit untersucht. Dies erfolgt direkt durch das gezielte Sammeln von Zecken und ihrer anschließenden Speziesbestimmung (Boinas et al., 2004). Indirekt kann man das Vorhandensein dieser speziellen Lederzeckenart mittels eines Antikörper-ELISAs feststellen (Canals et al., 1990, Oleaga-Pérez et al., 1993). Dieser Test wurde während der Ausbrüche in Spanien für die Testung von Hausschweineseren entwickelt. Bisher gibt es weder Hinweise für das Vorkommen von *Ornithodoros* spp. in Zentraleuropa, noch dafür, dass das Virus in den in Zentraleuropa beheimateten Schildzecken (*Ixodidae*) und Lederzeckenarten (*Argasidae*) in der Lage ist, sich zu replizieren (de Carvalho Ferreira et al., 2014). Da es sich bei dem ASPV um ein Arbovirus handelt, wurden weitere Arthropoden auf ihre potentielle Vektorfunktion hin untersucht. Hierzu zählte beispielsweise der Wadenstecher (*Stomoxys*). In

diesem kann sich das Virus jedoch nicht replizieren. Eine mechanische Übertragung ist hingegen möglich (Mellor, 1987). Da nicht sämtliche Zecken und Arthropoden umfassend untersucht werden können, kann eine mechanische Übertragung durch weitere Arten nicht ausgeschlossen werden.

2.5 Verbreitung

Die ASP ist eine auf dem afrikanischen Kontinent weit verbreitete Seuche. Seit ihrer ersten Beschreibung wurde die Erkrankung vielfach nach Europa, Nord- und Südamerika eingetragen.

Erstmals wurde die ASP 1920 in Kenia als ein akutes hämorrhagisches Fieber des Schweins beschrieben. Die Erkrankung konnte eine Mortalität von 100% in Hausschweinen erreichen (Montgomery, 1921). Zunächst wurde als Ursprung der Infektion der Kontakt zu Warzenschweinen vermutet (Montgomery, 1921).

Die ersten gehäuften Meldungen stammten aus dem südlichen und östlichen Afrika (Bastos et al., 2004). Über Zentral- und Westafrika erfolgte die Weiterverbreitung bis hin zu den Inseln des indischen Ozeans. Hierzu zählten Madagaskar (1998) (OIE, 2014d, Rousset et al., 2001) und Mauritius (2007) (Costard et al., 2009).

Der erste Ausbruch außerhalb des afrikanischen Kontinents wurde 1957 in Portugal gemeldet (Costard et al., 2009). Als Ursache wurde damals das Verfüttern virushaltiger Speiseabfälle von Transkontinentalflügen an Schweine angenommen (Sanchez-Vizcaino et al., 2014). Dieser erste Fall konnte schnell erradiziert werden (Costard et al., 2009). Weitere Ausbrüche folgten in Frankreich (1964, 1967 und 1977), Italien (1967, 1980), Malta (1978), Belgien (1985) und den Niederlanden (1986) (Costard et al., 2009, Sanchez-Vizcaino et al., 2014). Jeder Neueintrag konnte damals zügig erradiziert werden. Eine Ausnahme bildet Sardinien. Auf der italienischen Insel ist die ASP seit der Einschleppung 1978 endemisch (Giammarioli et al., 2011). Bis Mitte der 1990er Jahre war die ASP zudem auf der iberischen Halbinsel (Portugal, Spanien) endemisch.

Von Spanien ausgehend kam es zu Ausbrüchen auf Kuba (1971) (Simeón-Negrín and Frías-Lepoureau, 2002). In den späten 1970er Jahren gab es weitere Ausbrüche in den Staaten der Karibik (Wilkinson, 1986). Ausgehend von Spanien oder Portugal wurde die ASP nach Brasilien eingeschleppt (1981). Als Ursache wurden hier Speisereste von Transkontinentalflügen, von Touristen eingeführte tierische Produkte und der erstarkte Handel vermutet (Lyra, 2006). In der Karibik wie auch in Nordamerika werden einige

Arthropoden, beispielsweise *O. coriaceus* und *O. turicata*, als Vektoren diskutiert (Hess et al., 1987).

Im Jahr 2007 kam es zu einer Einschleppung der Erkrankung in die Transkaukasusregion. Ausgehend von Georgien (Chapman et al., 2011) erfolgte die Weiterverbreitung in die Nachbarländer Armenien, Aserbaidschan und in Teile der Russischen Föderation (Rowlands et al., 2008, Sanchez-Vizcaino et al., 2013) (Abbildung 2). Zunächst erfolgte eine Nord-West-Ausbreitung mit Tendenz zur Ausdehnung in Richtung Europäische Union (EU) (Sanchez-Vizcaino et al., 2012, Mur et al., 2012, Lange et al., 2014). Die Komplexität des Seuchengeschehens wurde durch das Auftreten der ASP in Wildschweinen in den oben genannten Gebieten erhöht. (Khomenko et al., 2013, Gulenkin et al., 2011, Lange et al., 2014). Bereits Ende 2012 wurden über 400 Ausbrüche bei Haus- und Wildschweinen in weiten Teilen der westlichen Russischen Föderation gemeldet (Khomenko et al., 2013). Von 2012 bis zum Frühjahr 2014 breitete sich die ASP in die Ukraine (OIE, 2014c) und nach Weißrussland (OIE, 2013b) aus. Initial gab es im Jahr 2014 vier Fälle im Wildschwein im Grenzgebiet von Weißrussland, Polen und Litauen (OIE, 2014b, OIE, 2014a). Seitdem ist es zu weiteren Positivfunden in Polen (OIE, 2014f), Litauen (OIE, 2014a), Estland und Lettland (OIE, 2014e) gekommen (siehe Abbildung 2). Derzeit ist eine Verbreitung der Seuche in Richtung Nordwesten festzustellen (Gallardo et al., 2014) (Abbildung 2).

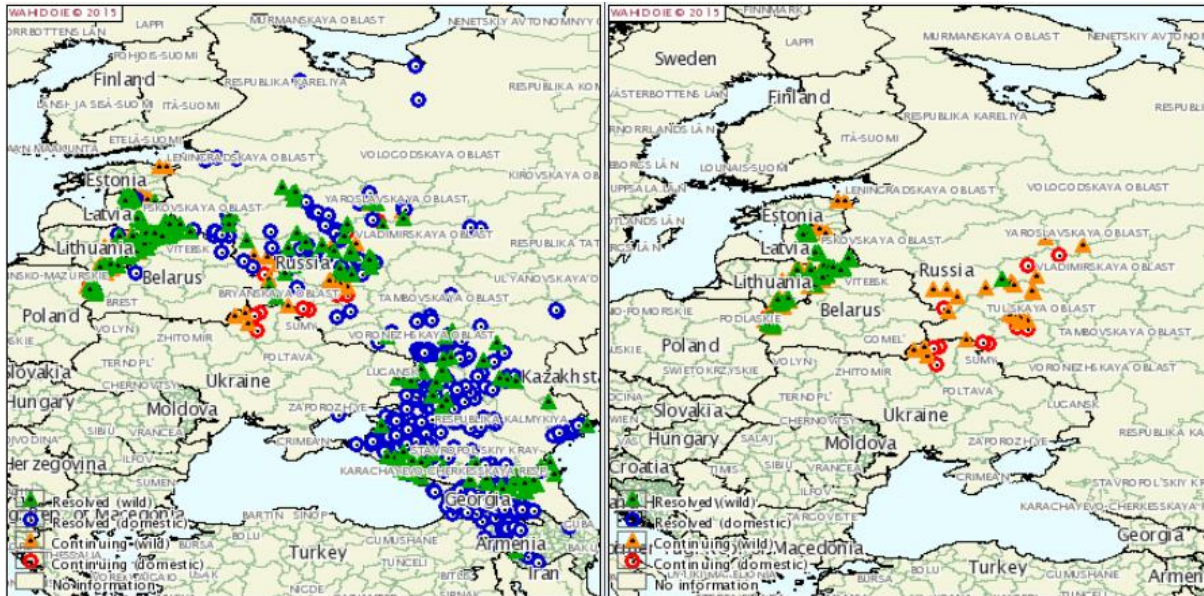


Abbildung 2: Verbreitung der Afrikanischen Schweinepest in der EU und in angrenzenden Ländern. Die linke Karte zeigt das aktuelle ASP-Geschehen seit dem 01. Januar 2007 bis zum 18. Februar 2015. Auf der rechten Karte sind die Ausbrüche von 2015 veranschaulicht (01. Januar bis 18. Februar 2015). Für beide Karten gilt, dass die Dreiecke Fälle im Wildschwein kennzeichnen. Die grünen Dreiecke stehen für abgeschlossene und die gelben Dreiecke für ein aktuelles Geschehen im Wildschwein. Die Kreise stehen für Ausbrüche im Hausschwein. Blaue Kreise kennzeichnen abgeschlossene und rote Kreise stehen für ein aktuelles Geschehen im Hausschwein.

(Quelle:

http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps)

Mit Hilfe von Genomanalysen kann die Herkunft des ASPV bei einem Neueintrag bestimmt werden. Grundlage bildet in der Regel die Sequenzierung des B646L (p 72). Anhand dieser werden ASPV-Isolate in 22 Genotypen eingruppiert (Bastos et al., 2003, Costard et al., 2009, Boshoff et al., 2007, Lubisi et al., 2007). Diese Genotypen sind oftmals auf bestimmte Regionen der Erde begrenzt (Abbildung 3). Bei epidemiologischen Fragestellungen kann diese Regionalität genutzt werden, um den Ursprung des Geschehens herauszufinden. Beispielsweise zeigten die Analysen von Isolaten aus Georgien, dass das Geschehen auf einen einzigen Eintrag des Genotyps II zurückzuführen ist (Rowlands, 2008). Dieser Genotyp kommt zurzeit endemisch in Mosambik, Sambia und auf Madagaskar vor (Rowlands, 2008, Costard et al., 2009) (Abbildung 3).

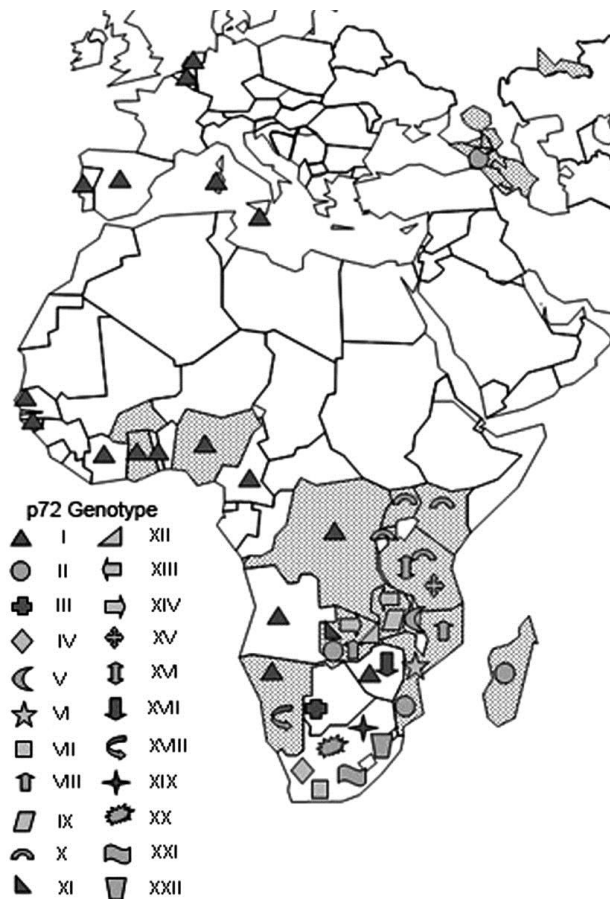


Abbildung 3: Übersicht über die Verteilung der 22 ASPV-Genotypen von 2003 bis 2008 (Costard et al., 2009).

Die Karte zeigt ASP-Ausbrüche von 2003 bis 2008. In Grau schraffiert sind Staaten mit gemeldeten Ausbrüchen. Die verschiedenen Symbole stehen für die zirkulierenden Genotypen (basierend auf der B646L (p 72) Sequenzierung), soweit bekannt (Bastos et al., 2003, Lubisi et al., 2007, Boshoff et al., 2007, Rowlands et al., 2008).

2.6 Labordiagnostik und Bekämpfungsstrategien

Aufgrund der großen sozio-ökonomischen Auswirkungen (Sanchez-Vizcaino et al., 2014, Sánchez-Vizcaíno et al., 2009) eines Eintrags der ASP in freie Gebiete ist es essentiell, dass zuverlässige und robuste diagnostische Methoden zur Verfügung stehen.

Als direkter Nachweis kann die Anzucht auf primären Blutmonozyten erfolgen, welche einerseits sehr sensitiv, andererseits recht langwierig und aufwändig ist. Dies beginnt bei der Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Diese können aus Knochenmark, Lungenlavagen oder gerinnungsgehemmtem Blut gewonnen werden (Malmquist, 1960, Wardley and Wilkinson, 1978, Martins et al., 1987). Die meisten Feldstämme sind mittels des Hämadsorptionstests (HAT) auf den isolierten Makrophagen eindeutig nachweisbar (Sierra et al., 1991, Malmquist, 1960, OIE, 2012, Anonymous, 2006), denn bei dem ASPV handelt es sich um das einzige bekannte Virus des Schweins, welches hämadsorbierend ist. Alternativ zum HAT kann ein direkter Immunfluoreszenztest (DIFT) an Kryoschnitten von Organen durchgeführt werden (Fernandez et al., 1992, Oura et al., 2013). Weitere direkte Nachweisverfahren sind ein kommerziell erhältlicher Antigen-ELISA (Anonymous, 2006) sowie die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (q-PCR, engl. *real-time polymerase chain reaction*) (King et al., 2003, Tignon et al., 2011, OIE, 2012, Anonymous, 2006, Sanchez-Vizcaino et al., 2014). Zudem wurden verschiedene Multiplex-PCRs entwickelt, welche verschiedenste Erreger, inklusive ASPV, simultan detektieren können (Wernike et al., 2013, Haines et al., 2013, Giammarioli et al., 2008).

Als indirekte Nachweismethoden stehen kommerziell erhältliche Antikörper-ELISAs zur Verfügung (Pastor et al., 1990, Perez-Filgueira et al., 2006). Weitere Möglichkeiten des Antikörpernachweises bestehen im indirekten Immunperoxidasetest (IIP) (Anonymous, 2006, Anonymous, 2003, OIE, 2012), dem Immunblotting (IB) oder der indirekten Immunfluoreszenzfärbung (IIF) (Cubillos et al., 2013). Solange es keinen zugelassenen Impfstoff gibt, sind positive Reaktionen bei den genannten Antikörpertests ein eindeutiges Indiz für eine vorangegangene Infektion mit dem ASPV (OIE, 2012, Anonymous, 2006, Sanchez-Vizcaino et al., 2014).

Auf nationaler Ebene wird die Bekämpfung der ASP durch die „Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest“ (Schweinepest-Verordnung) (anonymous, 1988) geregelt. In der Verordnung sind sowohl das Behandlungs- als auch das Impfverbot gegen die ASP verankert. Des Weiteren wird die Schweinehaltung und der

Transport von Schweinen in der „Schweinehaltungshygieneverordnung“ geregelt (SchHaltHygV) (Anonymous, 1999). Zudem wird darin die regelmäßige Betreuung der Schweinehaltung durch einen Bestandstierarzt vorgeschrieben, was unter anderem der frühzeitigen Erkennung von Tierseuchen dient. Die Anzeigepflicht hingegen wird im „Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen“ (Tiergesundheitsgesetz) (Anonymous, 2013) geregelt.

Im Hinblick auf das aktuelle Seuchengeschehen in den baltischen Ländern wurde der „Durchführungsbeschluss der Kommission“ (Anonymous, 2014b) angepasst und ist in der jeweiligen aktuellen Fassung rechtsgültig (momentan 2014/709/EU).

Nach einem Ausbruchsgeschehen werden von der zuständigen Behörde Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen angeordnet. Die Desinfektion des ASPV wird jedoch durch seine hohe Tenazität erschwert. Beispielsweise konnte nach sechs Monaten noch infektiöses Virus in Rohwurst nachgewiesen werden (OIE, 2013a). Auf verschiedenen Einrichtungsgegenständen ist der Virusnachweis einige Tage lang möglich (OIE, 2013a, Sánchez-Vizcaíno et al., 2009). Ferner werden pH-Wertschwankungen von pH 4 bis 11,5 sehr gut vom ASPV toleriert (Plowright and Parker, 1967, OIE, 2013a). Für eine sinnvolle Desinfektion sollte dieses Wissen angewandt werden. Als Hilfestellung hat die OIE (2013a) eine Liste mit auf Wirksamkeit getesteten Desinfektionsmitteln veröffentlicht. Auf dieser werden folgende Desinfektionsmittel als besonders wirksam genannt: Chloroform, Desoxycholat, Formaldehyd und Natronlauge. Des Weiteren kann Bestrahlung oder Erhitzung auf 60°C für 30 Min. bzw. auf 56°C für 70 Min. die Virionen abtöten (OIE, 2013a, Krug et al., 2012, Krug et al., 2011, Turner and Williams, 1999, Coggins, 1966).

3 ZIELE DER ARBEIT

Biologische Charakterisierung und Pathogenese

Nach dem erneuten Eintrag der Afrikanischen Schweinepest auf den eurasischen Kontinent im Jahr 2007 wurde mit ersten Pilotstudien am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) begonnen. Ziel war es, die aktuellen Stämme zu charakterisieren (Blome et al., 2013, Blome et al., 2012, Gabriel et al., 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese Bemühungen fortgesetzt werden, wobei insbesondere die potentielle Dosisabhängigkeit der Infektionsverläufe im Vordergrund stand.

Darüber hinaus sollten vergleichende Studien mit aktuellen Isolaten aus Litauen (2014), Sardinien (2008) und Kenia (2005) durchgeführt werden um einen umfassenden Überblick zu gewinnen. Ferner war es das Ziel, diese aktuellen Daten den praktizierenden Tierärzten, Schweinehaltern und Jägern in geeigneter Weise zur Verfügung zu stellen und sie dafür zu sensibilisieren.

Überwachungs- und Bekämpfungsstrategien

Aufgrund der sich verändernden Seuchenlage war es notwendig einfache und praxistaugliche Beprobungsverfahren für Fallwild zu entwickeln und zu validieren. Für diesen Zweck wurden drei verschiedene Tupfersysteme mit experimentell gewonnenen Blut- und Organproben getestet. Das primäre Ziel dieser Studien war es, die Probennahme für die passive Überwachung der ASP und KSP beim Fallwild deutlich zu vereinfachen und die Zahl der Einsendungen zu erhöhen.

4 RESULTATE

Die folgenden Publikationen sind nach Themengebieten sortiert.

Die Referenzen jedes Manuskripts sind, wie das entsprechende Journal es vorsieht, angeordnet und formatiert. Sie befinden sich nicht noch einmal am Ende dieser Arbeit. Dies gilt ebenso für Abbildungen und Tabellen.

4.1 Biologische Charakterisierung und Pathogenese

4.1.1 Course and transmission characteristics of oral low dose infection of domestic pigs and European wild boar with a Caucasian African swine fever virus isolate

Jana Pietschmann¹, Claire Guinat⁵, Martin Beer¹, Valery Pronin², Kerstin Tauscher³,
Anja Petrov¹, Günther Keil⁴, and Sandra Blome^{1*}

¹ *Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Germany*

² *National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia, 601120 Pokrov, Petushki area, Vladimir region, Russia*

³ *Department of Experimental Animal Facilities and Biorisk Management, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Germany*

⁴ *Institute of Molecular Biology, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, 17493 Greifswald – Insel Riems, Germany*

⁵ *Royal Veterinary College, Veterinary Epidemiology, Economics and Public Health Group, Hatfield, United Kingdom*

*Corresponding author:

Dr. Sandra Blome

Phone: +49-38351-71144

Fax: +49-38351-71275

Email: sandra.blome@fli.bund.de

*Archives of Virology, 2015
zum Druck angenommen*

Abstract

In 2007, ASF virus (ASFV) was introduced into the Trans-Caucasian countries and Russia. Since then, it has spread alarmingly and reached the European Union. The causative ASFV strains are highly virulent and lead to almost 100% mortality under experimental conditions. However, the possibility of dose dependent disease courses has been discussed. For this reason, a study was undertaken to assess the risk of chronic disease courses and carriers developing upon low dose oro-nasal infection in domestic pigs and European wild boar.

It was demonstrated that very low doses of ASFV are sufficient to infect especially weak or runting animals by the oro-nasal route. Some of these animals did not present clinical signs indicative for ASF, especially almost no fever. However, no changes were observed regarding the onset, course and outcome of infection for the individual animal as assessed by diagnostic tests. After amplification of ASFV by these animals, pen- and stable-mates got infected and developed acute lethal disease courses that were comparable among all animals. Thus, no indications exist for prolonged or chronic individual courses upon low dose infection in either species.

The scattered onset of clinical signs and pathogen detection within and among groups confirms moderate contagiousity that is strongly linked with blood contact.

In conclusion, the prolonged course on “herd-level” together with the exceptionally low dose that proved to be sufficient to infect a runting wild boar could be most important for disease dynamics in wild boar populations and under backyard settings.

Keywords: African swine fever, Caucasian ASFV strain, low dose infection, host responses, wild boar

1. Introduction

African swine fever (ASF) is one of the most complex and important viral diseases of pigs. Clinical signs depend on several host and virus factors and may vary from almost inapparent disease to a hemorrhagic fever-like illness [16, 26]. At this time, no vaccine is available and control is based on rapid laboratory diagnosis and strict, mandatory sanitary measures [29]. The disease is notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE).

The causative agent is African swine fever virus (ASFV), a large, complex, double-stranded DNA virus that is the sole member of the genus *Asfivirus* and the family *Asfarviridae* [30]. Vertebrate hosts are members of the family *Suidae*, e.g. warthogs (*Phacochoerus* spp.), bush pigs (*Potamochoerus* spp.), European wild boar (*Sus scrofa scrofa*), and domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) [6, 21]. Warthogs especially can be regarded as reservoir hosts in Africa. These animals do not show marked clinical signs and are part of a sylvatic cycle with soft ticks of the genus *Ornithodoros* [6, 23].

African swine fever is endemically present in several countries of Sub-Saharan Africa, but has also caused long-lasting outbreaks on the Iberian Peninsula and short epidemics in other European and American countries in the second half of the 20th century [1]. African swine fever is also endemic on Sardinia, Italy [9, 18]. In 2007, ASFV was introduced into Georgia and subsequently into other Trans-Caucasian Countries and the Russian Federation [14]. Since then, it spread alarmingly towards free areas and only recently, outbreaks have been confirmed in Belarus, Ukraine, and in European Union member states Poland, Lithuania, Latvia, and Estonia (WAHID, status report as of January 20th 2015). From the beginning of the outbreak, ASF infected both domestic pig and wild boar populations [12], and now affects all sectors of the Russian pig industry and production [10, 14]. The causative ASFV strains belong to genotype II and are closely related to strains that have been found in Madagascar, Zambia, and Mozambique [27]. Based on partial sequences, strains from 2007 to 2011 are almost identical [19]. Experimental infections showed that these strains are highly virulent for domestic pigs and European wild boar [8], irrespective of their age [2]. In all experimental infections, 100 % mortality was observed within less than 12 days.

However, reports exist (Kolbasov, D., Alonso, C., personal communication) that low dose ASFV infections may lead to prolonged incubation times and altered clinical courses. Dose dependence was also seen with virulent strains in recent pathogenesis studies, with different doses and routes of inoculation [13].

Especially in wild boar, oral low dose infections are likely, either by intake of small pieces of pig carcasses or ASFV-containing refuse. The same may hold true for domestic pigs in

backyard settings. If this could lead to chronic forms of disease or the development of carrier status, the impact on disease dynamics would be high: prolonged courses may facilitate the establishment of an endemic transmission cycle and hamper timely diagnosis. For this reason, a study was undertaken to assess the risk of chronic disease courses and carriers developing upon oro-nasal infection with low (100 and 10 haemadsorbing units, HAU, respectively) doses of ASFV strain “Armenia08” in domestic pigs and European wild boar. Parameters recorded upon inoculation included clinical signs, levels of viraemia in blood and oropharyngeal swabs, serological responses, pathomorphological changes, and virus distribution in selected organs. Moreover, transmission characteristics were assessed.

2. Materials and methods

2.1. Experimental settings

The study comprised a total of fifteen European wild boar with an age of four to five months, and fifteen domestic pigs with an age of eight to twelve weeks. Upon arrival in the high containment facilities of the Friedrich-Loeffler-Institute (FLI), all animals were individually ear-tagged and divided into three experimental groups. Each group was placed in a separate stable unit. All applicable animal welfare regulations, including EU Directive 2010/63/EC and institutional guidelines, were taken into consideration. The animal experiment was approved by the competent authority under reference number 7221.3-1.1-015/12.

Group I consisted of six wild boar and six domestic pigs. Commingling was planned. However, due to unforeseen hierarchic encounters among these animals, domestic pigs and wild boar had to be placed in separate pens within the stable (shared room, ventilation, tools, and trough). In group II, six wild boar and six domestic pigs were kept commingled in one pen. The same applies for the group of negative controls (group III) that consisted of three animals of each subspecies.

During the acclimatization phase, the wild boar received metaphylactic treatment with Enrofloxacin (Baytril 10%, Bayer Animal Health) and Ivermectin (Ivomec S, Merial GmbH) to eliminate parasites and to control inapparent bacterial infections. Thereafter, animals of groups I and II were oro-nasally inoculated with 2 ml of a diluted spleen suspension containing 100 and 10 hemadsorption units (HAU) of ASFV strain “Armenia08”, respectively. Group III was mock-inoculated with the same amount of cell culture medium.

Clinical signs and rectal temperatures of domestic pigs were evaluated daily. In contrast, rectal temperatures of the wild boar were measured only on sampling days or with special indication. Fever was defined as a body temperature above 40.0°C for at least two consecutive

days. For a harmonized evaluation, and to ensure comparability with other animal trials within the ASFORCE project (<http://asforce.org/>), the clinical signs were documented based on a scoring system. In brief, the parameters were: temperature ($< 39^{\circ}\text{C} = 0$ points; $\geq 40,0^{\circ}\text{C} < 40,5^{\circ}\text{C} = 3$ points; $\geq 40,6^{\circ}\text{C} < 41^{\circ}\text{C} = 4$ points; $> 41,1^{\circ}\text{C} = 5$ points), anorexia (reduced eating = 1 point; only picking at food = 4 points; not eating = 6 points), recumbency (lethargic = 1 point; animal gets up only when touched = 2 points; gets up only slowly when touched = 4 points; remains recumbent when touched = 6 points), skin (score points from 0 to 3 depending on combined assessment of skin erythema, edema, and hemorrhages), swelling of joints (joint swelling = 1 point; severe swelling with lameness = 4 points), breathing (labored and/or coughing = 1 point; severe = 3 points), ocular discharge (mild = 1 point; moderate = 2 points), digestive findings (mild diarrhea for less than 24 h = 1 point; moderate findings, e.g. diarrhea and vomiting for more than 24 h = 3 points; severe, bloody diarrhea and/or bloody urine = 4 points), and neurological disorders (ataxia, paralysis, convulsion) were assigned score points from 0 to 6 depending on the occurrence and severity of signs. The sum of score points was recorded as clinical score (CS).

Levels of viraemia, virus distribution, virus shedding as well as immune responses were assessed. For this purpose, sera and EDTA blood samples were collected along with oropharyngeal swabs. Those samples were collected prior to inoculation and at 2, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 21, 28, 34, and 36 days post inoculation (dpi).

Moribund animals and animals that showed unjustifiable suffering as assessed by the responsible veterinarian were euthanized through intracardial injection of embutramide (T61, Merck) after deep anesthesia with tiletamine/zolazepam (Zoletil®, Virbac). Necropsy was performed on all animals, and at the same time tissue samples (lymphnodes, spleen, tonsil, salivary gland, lung, and liver) were collected.

2.2 Viruses

The virus used in this trial was isolated from a diagnostic specimen sent by the Central Veterinary Laboratory, Yerevan, Armenia, in February 2008. This isolate belongs to genotype II and is closely related (identical based on the routine genome fragments for phylogenetic analyses) with strains circulating in Russia and other affected countries in Eastern Europe. For experimental infection, a spleen suspension was produced and diluted with cell culture medium to obtain a titer of 10 and 100 HAU/ml, respectively. The dilutions were based on an end-point virus titration of the original material on macrophages derived from peripheral

blood monocytic cells (PBMC). Upon application, back titration was carried out to confirm the administered dose.

2.3. Cells

Blood for the preparation of PBMC derived macrophages was collected from domestic donor pigs. In brief, PBMCs were obtained from anticoagulated blood using Ficoll-Paque density gradient media (GE Healthcare Life Sciences) combined with lysis of remaining erythrocytes through buffered ammonium chloride solution (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA/pH 7.4). Cells and viruses were grown in cell culture medium (RPMI-1640 with 10% foetal calve serum (FCS) or alternative RPMI-1640 with HEPES and 10% FCS) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. To facilitate maturation of macrophages, GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) was added to the cell culture medium at 2 ng/ml.

2.4 Laboratory investigations

2.4.1 Processing of samples

Oropharyngeal swabs were soaked in 1 ml medium, vortexed for approximately 15 seconds, incubated for one hour at room temperature, and afterwards decanted in microcentrifuge tubes.

Serum samples, which were obtained from native blood by centrifugation at 3300 x g at 20°C for 20 min, were aliquoted and stored at -70°C. Tissue samples of tonsil, spleen, salivary gland, liver, lung, and lymph nodes were collected at necropsy and stored at -70°C until further use. For real-time polymerase chain reaction (qPCR) and virus isolation (hemadsorption tests), tissue samples were homogenized in 1 ml DMEM using a TissueLyser II (QIAGEN® GmbH).

2.4.2 Virus detection

For quantitative real-time PCR (qPCR), viral DNA was extracted from anticoagulated whole blood samples and oral swabs using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) with 75 µl blood and 140 µl swab material, respectively. For purification of DNA from tissues, the QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) was used according to the manufacturer's instructions. Both extraction methods were modified through the addition of an internal control DNA (5 µl per reaction with 2 x 10⁵ copies per µl). Subsequently, qPCR was performed according to the

protocol published by King et al.[15]. A dilution series of a synthetic standard with known copy numbers was used to quantify genome copies in the respective samples.

To detect ASFV in blood and tissue samples, haemadsorption tests (HAT) on PBMC derived macrophages were carried out according to slightly modified standard procedures [4]. In brief, 200 µl of a PBMC preparation (5×10^6 cells/µl) were seeded into 48 well microplates. After 16 - 24 hours non-adherent cells were removed and cell culture medium containing GM-CSF replenished (200 µl). Thereafter, the culture was incubated for 24 to 48 h to allow initial maturation of macrophages. Subsequently, 100 µl of sera or organ suspensions were added. After another 24 h, 40 µl of a 1 % homologue erythrocyte dilution were supplemented. All samples were tested in duplicate. For readout, cultures were analysed for haemadsorption phenomena over a period of two to four days.

Virus back-titration was performed by end point titration of the diluted spleen suspensions. For read-out, haemadsorption (haemadsorbing units, HAU) was utilized. In this case, the PBMC preparation was seeded into 96 well microplates, the test volume was 100 µl per dilution step and 20 µl of a 1 % homologue erythrocyte dilution were supplemented. Here, all samples were tested in quadruplicate.

2.4.3 Antibody detection

Sera were tested for the presence of ASPV p30-specific antibodies using the SVANOVIR ASFV-Ab ELISA in the confirmatory plate format (Boehringer Ingelheim Svanova), and for ASPV p73-specific antibodies using the INGEZIM PPA COMPAC ELISA (Ingenasa) according to the manufacturer's instructions.

Sera taken at the day of euthanasia were tested in indirect immunoperoxidase tests according to standard protocols provided by the European Union Reference Laboratory for ASF.

2.4.3 Estimation of transmission parameters

A limited number of animals became infected by the initial oral low dose inoculation but contact transmission was observed in all experimental groups. Consequently, transmission parameters such as the basic reproduction number (R_0) (defined as the average number of newly infected cases caused by one infectious individual during its infectious period in a susceptible population [31]) were estimated for each contact scenario. Based on clinical scores and laboratory results, quantification of within-pen (R_{0w}) and between-pen (R_{0b}) basic reproduction numbers was performed using the stochastic SEIR (susceptible-infected-

infectious-dead) model fitted on the experimental data using a maximum likelihood method [7, 17].

2.4.4 Data and statistical analysis

All data were recorded and evaluated using Microsoft Excel 2010 (Microsoft Deutschland GmbH), SigmaPlot for Windows version 11.0 (Systat Software, Inc.) and R statistical software (<http://www.r-project.org/>).

3. Results

3.1. Back titration of challenge virus dilutions

In order to assess the true virus titers administered, back titrations of challenge virus dilutions were conducted. The suspension with a hypothetical titer of 100 HAU/ml showed a mean titer of 25 HAU/ml in back titration. The second suspension with an assumed titer of 10 HAU/ml had a mean virus titer of 3 HAU/ml in back titration. Both values are within the expected biological variation for virus dilutions and titrations.

3.2. Clinical findings and virus detection

Clinical findings and virus detection group I:

Wild boar: The smallest wild boar in this group, WB7, showed positive reactions in qPCR from EDTA blood (see figure 1), and in HAT from serum, starting from 4 dpi. Oral swabs of this animal were found positive in qPCR from 6 dpi (see figure 2). These laboratory findings were accompanied by reduced feed intake from 5 dpi, and watery diarrhea from 8 dpi. Slightly elevated body temperatures were observed on sampling days 2 dpi, 6 dpi, and 8 dpi (temperatures between 40.0 and 40.5°C, see supplementary table 1). In general, WB7 appeared runted and was found dead 11 dpi. By that time, it showed (post mortal) biting lesions around the left eye. The other wild boar appeared slightly depressed on 11 dpi. One day later, three out of five wild boar (WB3, WB10 and WB11) still showed slight depression, in one case (WB3) accompanied by frequent laboured breathing. To link these clinical observations with laboratory results, an additional blood sampling was conducted on day 12 for two of the wild boar that showed depression on that day. These samples were positive in qPCR. From 13 dpi, all wild boar showed worsening clinical signs (see figure 3). They included depression, anorexia, conjunctivitis, accelerated and labored breathing, vomiting, and slight ataxia. On 14 dpi, all remaining wild boar showed febrile temperatures (40.3°C to 41.7°C, see supplementary table 1). One animal had to be euthanized due to severe dyspnoea

upon blood sampling on 14 dpi (WB10). All samples were positive on that day in qPCR from blood and swabs as well as in HAT from serum. One exception was a negative swab from WB10 (see figure 2). Animals WB2 and WB3 were found dead on 17 dpi whereas WB1 and WB11 were euthanized in a moribund state. Spleen and blood samples taken at the day of death or euthanasia were strongly positive in qPCR ($ct < 22$) and HAT. Maximum clinical scores ranged from 11 to 13 score points (see figure 3), and overall mortality amounted to 100% within 17 days (see figure 4).

Domestic pigs: While the wild boar showed clinical ASF, all domestic pigs (kept in the same stable but in another pen) remained clinically healthy up to 23 dpi (see figure 3 and supplementary table 1). At this day, one of the domestic pigs (DP26) showed first febrile temperatures (see supplementary table 1) which were not accompanied by any other clinical signs. However, fever continued up to day 28 pi when this animal had to be euthanized showing severe depression, labored breathing, anorexia, conjunctivitis, and neurological signs (ataxia, convulsions, nystagmus). On that day, all other domestic pigs were healthy (see figure 3) and showed physiological body temperatures (see supplementary table 1). These clinical findings were in line with virus detection. While animal DP26 was positive in all conducted virus detection methods, the other animals were still negative in qPCR from EDTA blood (see figure 1), and in HAT. However, weak positive reactions were observed in swabs (ct 34 to 35) of all but one of the remaining animals (see figure 2). At 30 dpi, two additional pigs showed fever and slight depression (DP22 and DP24). These animals showed high fever (see supplementary table 1) and worsening clinical signs (see figure 3) over the next few days and were euthanized 34 dpi. Two other animals (DP23 and DP27) showed first febrile temperatures and reduced liveliness 31 dpi. On that day, 4 out of 5 remaining pigs were positive in qPCR from blood and swab samples (see figures 1 and 2). These findings were accompanied by positive HAT. On the following sampling day (34 dpi), all pigs were found positive in qPCR (see figures 1 and 2) and HAT and had to be euthanized 34 dpi (DP23) and 36 dpi (DP27), respectively. The remaining animal (DP25) first showed febrile temperatures 33 dpi and was euthanized 36 dpi. Maximum clinical scores ranged from 10 (DP23) to 20 (DP26) (see figure 3). Mortality amounted to 100 % within 36 days (see figure 4).

Clinical findings and virus detection group II:

Wild boar: One of the wild boar (WB13) showed a runting appearance from the beginning of the trial and received additional antibiotic and antiparasitic treatment. Still, this animal showed diarrhea and declining condition between 0 dpi and 6 dpi where it was found dead.

No fever was observed in this animal at any time point (see supplementary table 1). In blood and spleen samples taken during necropsy, WB13 yielded weak positive results in several repetitions. Another small animal (WB5) showed declining health from 9 dpi (see figure 3). At this time, reduced feed intake and labored breathing were observed, but again, fever did not occur (see supplementary table 1). On 10 dpi, the animal developed severe dyspnoea that got more severe upon blood sampling. By that time, dyspnoea was accompanied by bloody foam at the nostrils (lung edema). The animal was euthanized in a moribund state. This animal was positive in qPCR from EDTA blood (see figure 1) and oropharyngeal swabs (see figure 2), as well as in HAT, from 4 dpi. At 10 dpi, all remaining animals of this group were negative in qPCR (see figures 1 and 2) and HAT. The remaining wild boar developed fever between 14 dpi and 19 dpi (see supplementary table 1). First qPCR and HAT positive were obtained from animal WB6 at 14 dpi. On the subsequent sampling day (17 dpi), 3 out of 4 remaining wild boar were found positive in qPCR from EDTA blood (see figure 1) of which 2 were also positive in HAT. Swab samples were found positive for 2 of the 3 animals that showed positive reactions in blood (see figure 2). From 19 dpi, all wild boar yielded positive results in all pathogen detection tests. Fever was again accompanied by depression, reduced feed intake, labored breathing, and ataxia. The animals had to be euthanized approximately 5 to 7 days after the onset of first clinical signs that is, between 18 dpi and 23 dpi. Spleen and blood samples taken at the day of death or euthanasia were found positive in qPCR and HAT. Maximum clinical scores ranged from 14 to 18 (see figure 3), and 100 % mortality was observed within 23 days (see figure 4).

Domestic pigs: Up to day 10, all domestic pigs remained negative in all pathogen detection tests, and elevation in body temperature (see supplementary table 1) were only observed in combination with inflammatory joint lesions in three animals (DP19, DP20 and DP21). ASF related fever was observed starting between 12 dpi (DP21) and 19 dpi (DP20). From 13 dpi, the animals developed progressing depression, anorexia, labored breathing, and skin reddening. At 14 dpi, 3 out of 6 animals showed strong positive reactions in qPCR from EDTA blood samples (see figure 1). Two of these animals were also found positive in HAT. At that time point, 5 out of 6 animals showed positive reactions in oropharyngeal swabs (see figure 2). At 17 dpi, 5 out of 6 animals yielded positive results in qPCR from EDTA blood (see figure 1) and in HAT. Swab samples were positive for 5 out of 6 animals but these findings did not completely match the above mentioned results: While the negative animal had a weak positive swab result (65 genome copies per μ l), one positive animal remained negative. On the following sampling points, all remaining domestic pigs were positive in all

pathogen detection tests. Blood and spleen samples taken at the day of death/euthanasia were found positive in qPCR and HAT. Clinical courses were comparable among all animals of this group with maximum clinical scores ranging from 12 to 16 (see figure 3). All animals had to be euthanized between 17 dpi and 23 dpi (100 % mortality, see figure 4).

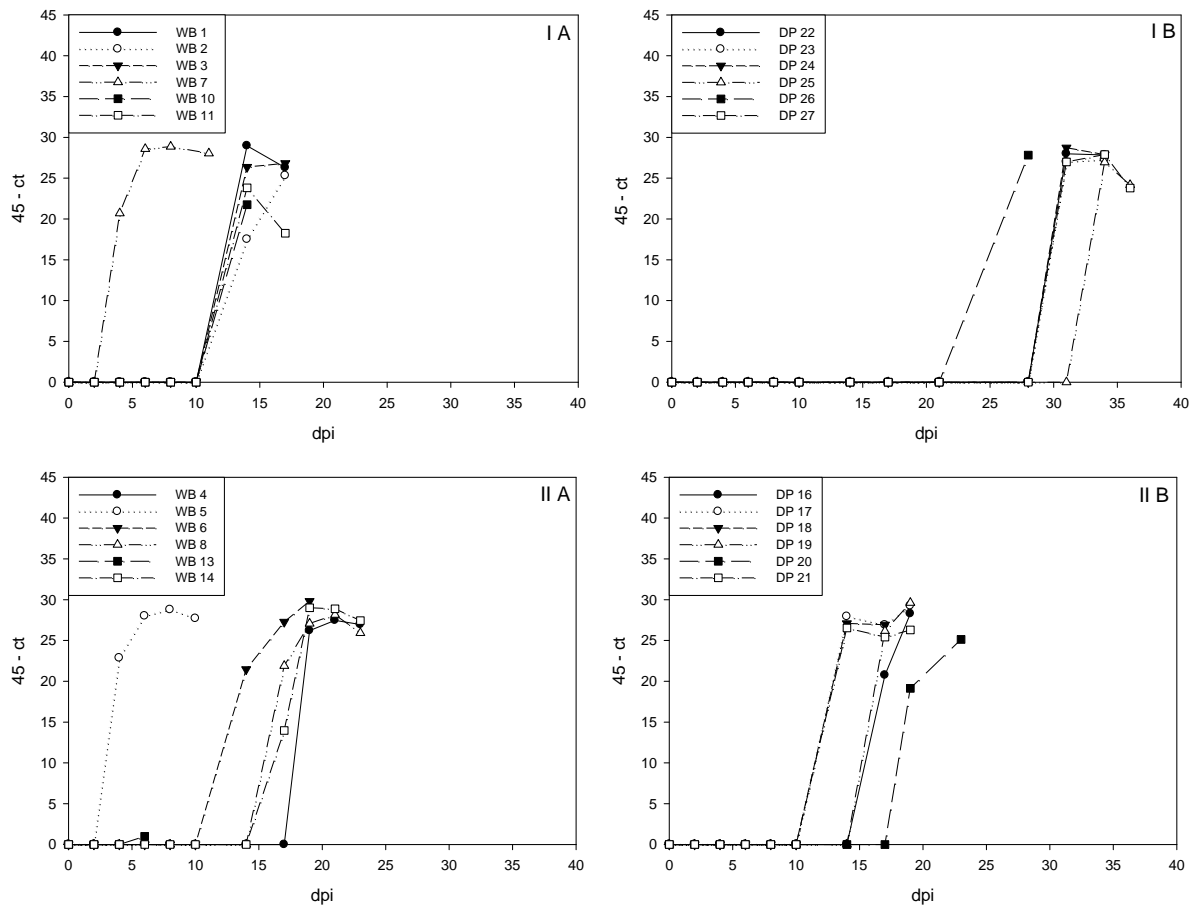


Fig. 1. PCR results for EDTA-blood samples depicted as 45-ct. Figures IA and B show results for group I which was inoculated with 100 HAU, figures IIA and B display results for animals of group II which received 10 HAU. Figures A illustrate wild boar, and figures B domestic pigs. WB = wild boar, DP = domestic pig, dpi = days post infection.

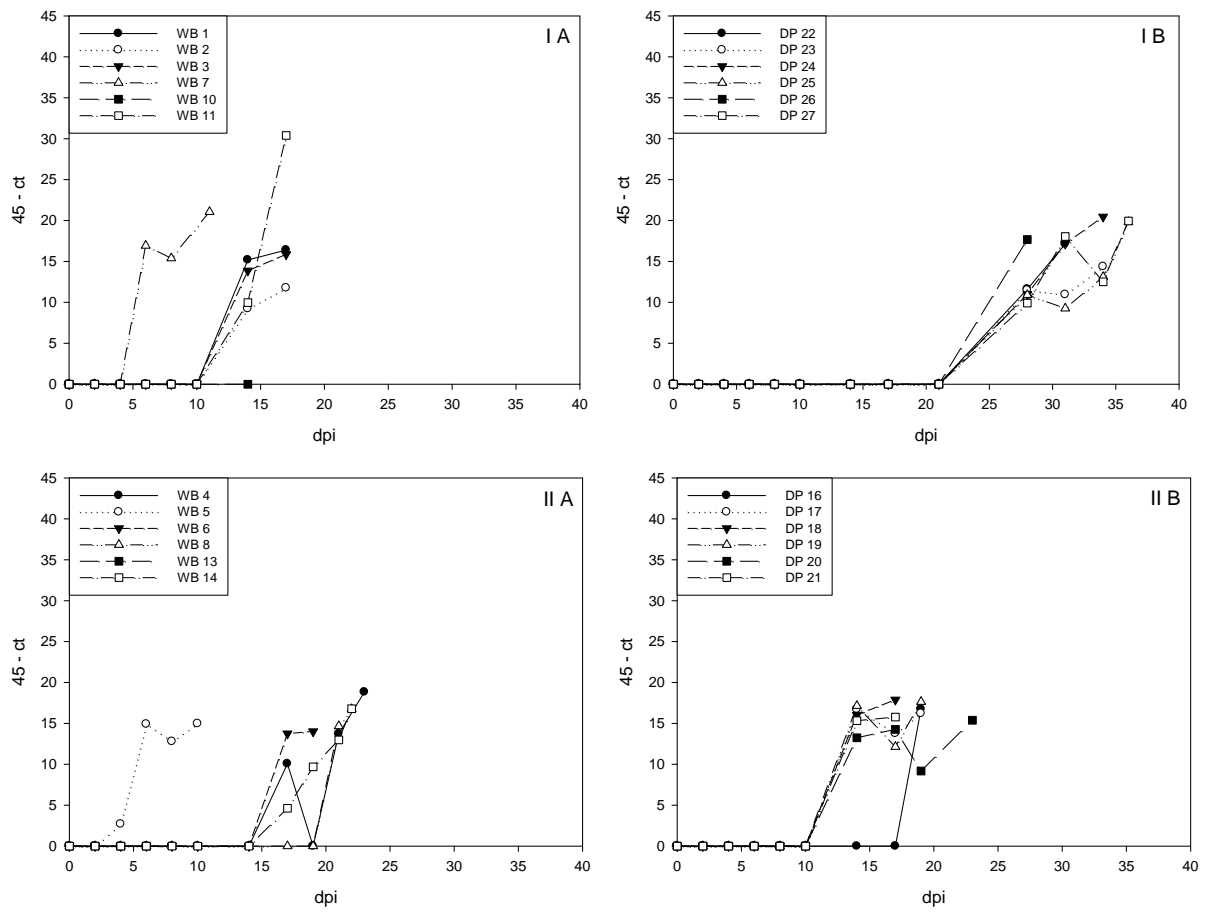


Fig. 2. PCR results for oro-pharyngeal swabs depicted as 45-ct. Figures IA and B show results for group I which was inoculated with 100 HAU, figures IIA and B display results for animals of group II which received 10 HAU. Figures A illustrate wild boar, and figures B domestic pigs. WB = wild boar, DP = domestic pig, dpi = days post infection

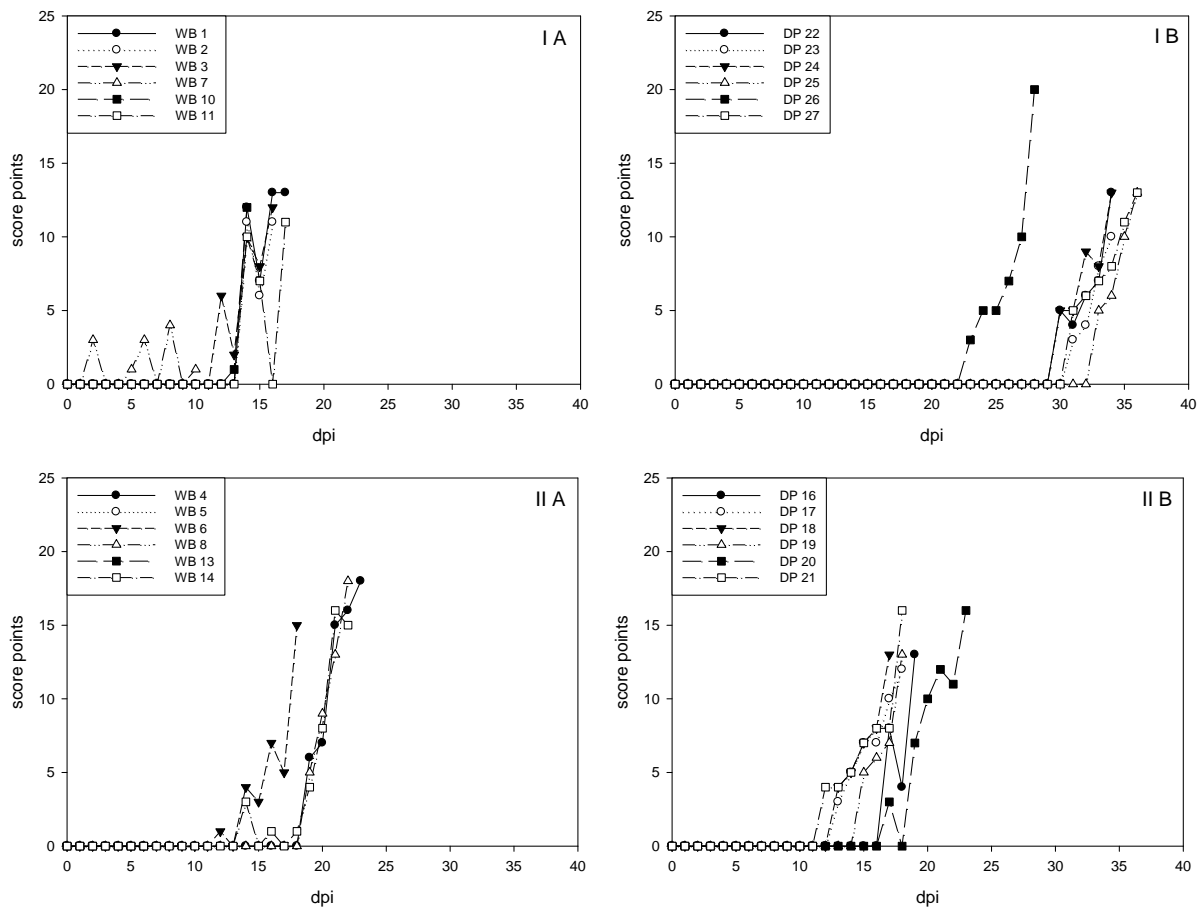


Fig. 3. Daily summation of clinical score points (excluding neurological findings) per individual animal. The clinical signs were documented based on a harmonized scoring system. In brief, parameters temperature, anorexia, recumbency, skin, swelling of joints, breathing, ocular discharge, digestive findings, and neurological disorders were assigned score points from 0 to 6 depending on the occurrence and severity of clinical signs. The sum of score points was recorded as clinical score (CS).

WB = wild boar, DP = domestic pig, dpi = days post infection; I A = group I, wild boar; I B = group I, domestic pig; II A = group II, wild boar; II B = group II, domestic pig

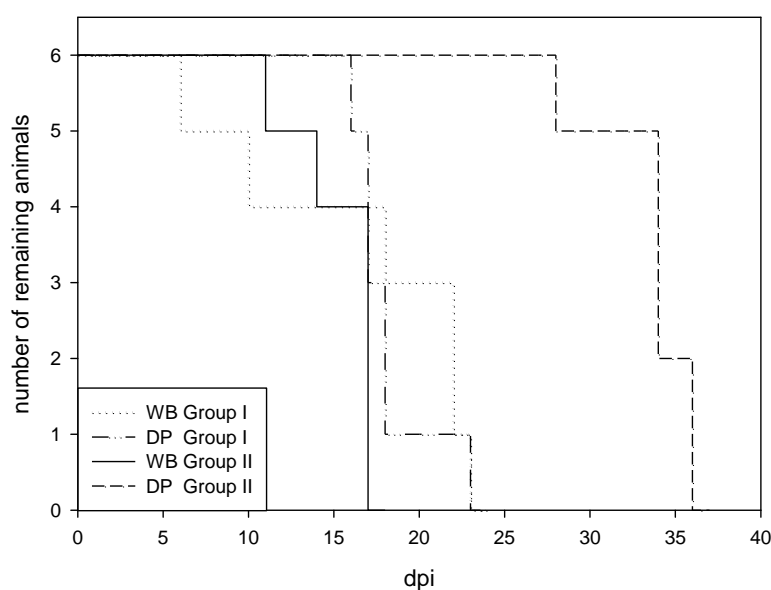


Fig. 4. Survival analyses for all inoculated groups.

WB = wild boar, DP = domestic pig, dpi = days post infection

3.3. Pathomorphological changes

Pathomorphological changes were comparable among all infected animals. Lesions included, in different degrees of severity, enlarged, hemorrhagic and edematous lymph nodes (gastro-hepatic lymphnodes were often ebony-coloured and severely enlarged), splenomegaly, pulmonary edema, gall-bladder edema, petechiae in the kidneys, and hemorrhagic gastritis. Most animals showed signs of coagulation disorders (e.g. huge hematomas in connection with small biting lesions, missing clot formation in the heart and in large vessels). The latter was more severe in wild boar. In individual animals, secondary infections of the respiratory and gastro-intestinal tract were found.

Clinical and pathomorphological findings group III:

The control group remained healthy throughout the experiment and did not show any pathomorphological changes related to ASF. Moreover, all animals remained negative in all pathogen and antibody detection tests throughout the trial.

3.4. Antibody detection

With only a few exceptions, all antibody detection techniques yielded negative results for the samples taken prior to inoculation and at the end of the trial. Two sera (from the runting animals WB5 and WB7) gave doubtful results in the INGEZIM PPA COMPAC ELISA

(Ingenasa) that detects p73-specific antibodies. These doubtful results could not be confirmed by the indirect immuno-peroxidase test. The latter gave three doubtful reactions for domestic pigs (repeatedly weak reactivities mingled with high background). However, no reactivities were seen for these sera (DP20, DP21, DP27) in any of the ELISAs.

3.5. Transmission parameters

Estimation of transmission parameters was based on infection time assumptions (see figure 5). Animals were considered infectious when ASFV genome copies were recovered from blood samples. The latent period, that is the time period between the date of infection and the onset of infectiousness, was assumed to be 4 days. The infectious period, that is the time period between the onset of infectiousness and the date of death, ranged from 2 to 9 days. . Based on these assumptions deduced from clinical and laboratory diagnostic findings, the R_{0w} (within-pen) was estimated for the wild boar in group I at 6.1 (95% confidence interval (CI):0.6-14.5), while it was 5.0 (95% CI: 1.4-10.7) within the mixed group II. The basic reproduction number R_{0b} (between-pen) for the complete group I, that means the transmission between wild boar and domestic pigs, was estimated to be 0.5 (95% CI: 0.1-1.3).

Resultate

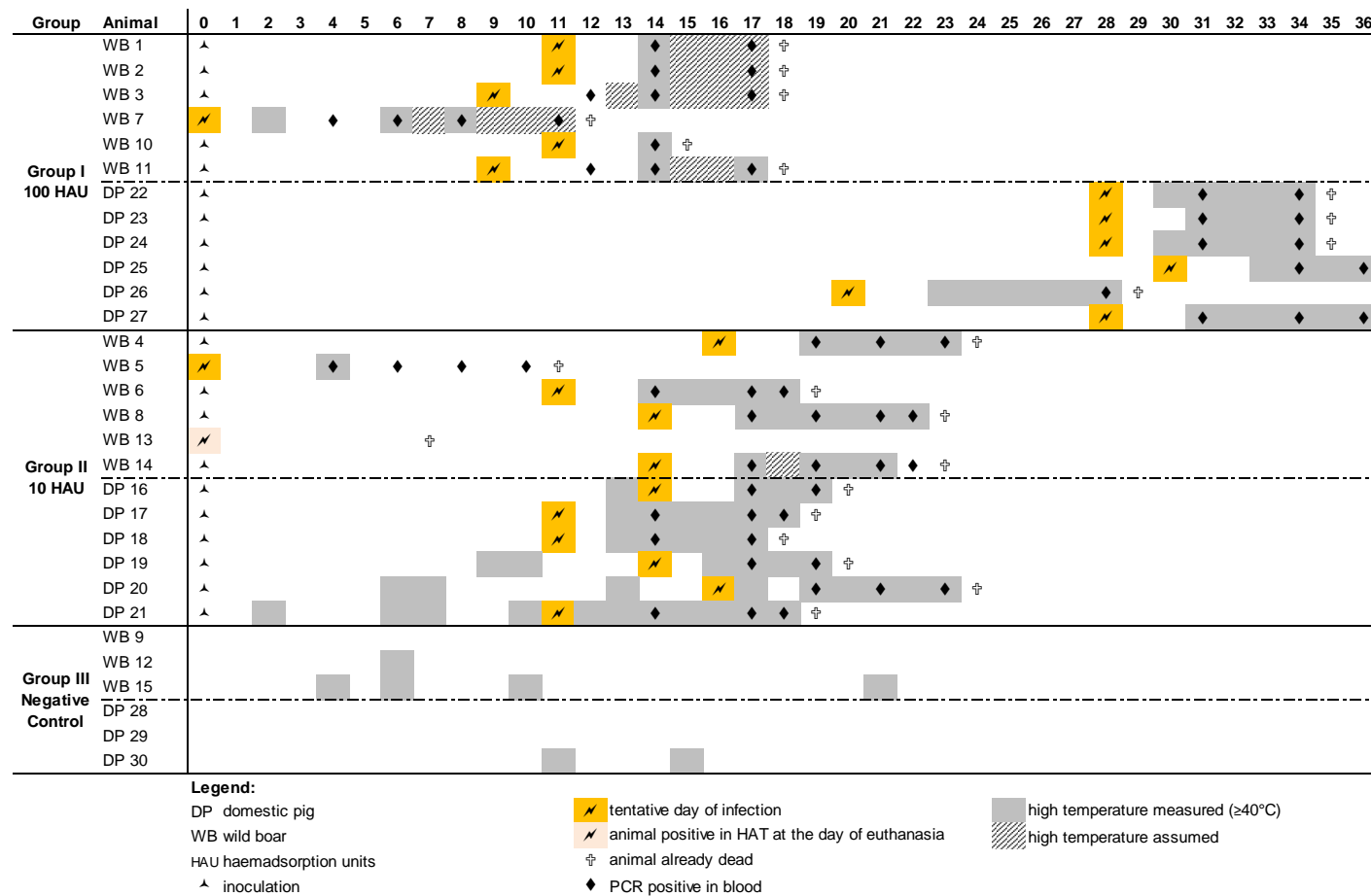


Fig. 5. This figure exemplifies the tentative course of infection based on clinical and laboratory diagnostic findings. Upon inoculation on day 0, only three animals got directly infected. All remaining animals were infected through contact with a probability bordering on certainty. The tentative time point of infection was estimated based on the assumption that first positive results in PCR are obtained between days 3 and 4 post infection, and that onset of viraemia coincides with fever. Body temperatures of wild boar were only measured on sampling days. In the case of high temperatures at two consecutive samplings, high temperatures were assumed also for the remaining time.

4. Discussion

African swine fever is currently circulating in Russia and shows a clear tendency to move towards free areas. Recent outbreaks in Eastern Member States of the European Union (WAHID, January 2015) are witnesses of the North-Western spread, but positive wild boar in Iran [25] show also a tendency to spread in a south-easterly direction. Despite the high virulence of the ASFV strains involved [3, 8], the disease is continuously present in backyard settings and in the wild boar population [14]. Especially the latter raises concerns for regions with high wild boar density (e.g. Central Europe), as endemic infections may hamper disease control and lead to substantial losses to the domestic pig industry. So far, it is believed that ASF outbreaks in wild boar fade out unless infection is reinforced or sustained by contact to infected domestic pigs or other sources of infection [5, 18, 22, 24, 28]. However, disease dynamics are still far from being understood and a role of chronic infections, carrier pigs or long term presence of infectious materials cannot be excluded.

Here, we investigated the impact of oral, low-dose ASFV infection on the course and outcome of the disease in domestic pigs and European wild boar. Inoculation doses were chosen to reflect contact to fomites, swill, excretions of infected animals, or contact with carcasses.

Upon infection with less than 10 HAU (3 HAU based on repeated back titrations), only the weakest animals of the respective group became directly infected. One of the animals apparently died from concomitant gastro-intestinal infections and general exhaustion prior to the onset of ASF related signs. However, it was found to be virus-positive in spleen and blood samples taken at the day of death (6 dpi). The other directly infected animal showed a frail and runting appearance but ran and fed with the group. While all previous experimental infections had always led to marked fever in all infected wild boar [3], fever was not a noticeable sign in the runting animals. Comparable results are known for CSF infections of wild boar (personal observations) and are worrisome with regard to the timely recognition of the disease. However, disregarding the clinical presentation, the course of infection was still comparable with previous experiments: Virus was first detected 4 dpi, and the animal died by 10 dpi. Four days after euthanasia of the second runting animal, four additional animals (two wild boar and two domestic pigs) were found positive in pathogen detection and developed an acute-lethal course of ASFV over the next few days. It was probably not by chance that these findings were exactly four days after the possible contact to bloody discharge from the nose and mouth of the runting wild boar. If infection is assumed four days prior to the first virus detection, the course and duration of infection was again comparable to the first case and to previous studies. The remaining animals followed similar courses. In all secondary cases,

clinical signs were accompanied by fever in both domestic pigs and wild boar. Virus was always found in blood and, to a lesser extent, in oro-pharyngeal swabs. Some results obtained from swab samples did not match the results obtained from blood (positive results in otherwise negative animals). This could be either due to more or less ubiquitous virus presence in the stable, or due to shedding prior to viraemia. The latter could be explained by the fact that tonsils and retropharyngeal lymphnodes are the primary replication sites after oral infection [21]. While all individual courses confirmed high virulence and acute-lethal illness lasting about 10 to 11 days, the group course lasted 23 days.

Interestingly, a quite similar picture was observed upon infection with 100 HAU. One frail and runting animal got directly infected and was positive in pathogen detection methods at 4 dpi. This animal showed mild and unspecific clinical signs including remittent raises in body temperature. However, temperature increases were only marginal compared to previous experiments (40.0 to 40.5°C). Only after amplification of ASFV in this animal, direct group-mates became infected. The infection of at least three additional wild boar was probably linked to contact with highly infectious blood from the initially-infected runting wild boar. These animals were found positive four days after the group had nibbled at the carcass of the directly-infected animal that had succumbed to infection during the night. After euthanasia of the wild boar, several days elapsed without noticeable signs in the sub-group of domestic pigs that was not kept commingled but in a neighboring pen of the same stable. However, infection also established in this sub-group and all animals developed an acute-lethal disease course. It was again seen that infection was confirmed in additional animals about four days after possible blood contact. How the sub-group of domestic pigs got infected can only be hypothesised. One possible explanation is that virus remained on water hoses or other fomites within the stable. At a certain time, probably 20 dpi, one animal got in contact with enough virus to get infected. When this animal (DP26) had again amplified the virus to very high titers, the rest of the group became infected. All courses followed the pattern described above. Completely lacking responses in genome and antibody detection methods may indicate acute infection, but personal observations have shown that incubation periods may be as long as 21 days, even with a Caucasian ASFV isolate (D. Kolbasov, personal communication).

To summarize the tentative transmission within and between groups, a hypothetical course of infection was drafted in figure 5. Here, the following assumptions underlie the graphs: first positive results are likely at 4 dpi (between 3 and 4 dpi). Usually, the onset of viraemia coincides with first fever reactions or other noticeable clinical signs [11, 20]. Following this hypothesis, sufficiency of very low doses of virus is combined with moderate contagiousity

and leads to a herd course that is a multiple of the individual duration. In the presented trial, the last animals were euthanized 36 days after first introduction of the virus. Under field conditions, diagnosis and timely intervention might be hampered and would be in contrast to the experiences with high dose inoculation experiments. The estimated basic reproduction numbers reflect moderate contagiousity with quite high numbers within a pen but low numbers between pens. Compared to studies by Guinat et al. (manuscript submitted) that showed R_0 numbers of 2.8 (95% CI: 1.3-4.8), the estimated parameters for within pen transmission are high. This could be due to the fact that different humane endpoint criteria were applied and by a greater frequency of contacts within the groups. However, it could also reflect high efficiency of ASF transmission by wild boar.

To further elucidate pathogenetic aspects, cellular responses of the primarily-infected, runting animals will be studied, since the reason for the obvious higher susceptibility of the runting wild boar remains unknown.

5. Conclusions

It was demonstrated that very low doses of ASFV are sufficient to infect especially weak or runting animals by the oro-nasal route. Some of these animals did not present any clinical signs indicative for ASF, especially almost no fever. However, no changes were observed regarding the onset, course and outcome of infection for the individual animal. After amplification of ASFV by these animals, pen- and stable-mates got infected and developed acute lethal disease courses that were comparable among all animals. Thus, no indications exist for prolonged or chronic individual courses upon low dose infection in either species.

The scattered onset of clinical signs and pathogen detection within and among groups confirms moderate contagiousity that is strongly linked with blood contact.

In conclusion, the prolonged course on “herd-level” together with the exceptionally low dose that proved to be sufficient to infect a runting wild boar could be most important for disease dynamics in wild boar populations and under backyard settings.

Acknowledgements

We would like to thank all animal caretakers and technicians involved in this study for their excellent work. We are also very grateful to William Gilbert for improving the readability of this paper. This work has been carried out as part of the European Union funded project ASFORCE (Seventh Framework Programme, FP7/2007-2013, under Grant Agreement n° 311931).

References

1. (2009) EFSA Scientific Report on ASF. pp 1-141
2. Blome S, Gabriel C, Dietze K, Breithaupt A, Beer M (2012) High virulence of African swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerg Infect Dis* 18:708
3. Blome S, Gabriel C, Beer M (2013) Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res* 173:122-130
4. Carrascosa AL, Bustos MJ, de Leon P (2011) Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Current protocols in cell biology* / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 26:Unit 26 14
5. Costard S, Jones BA, Martinez-Lopez B, Mur L, de la Torre A, Martinez M, Sanchez-Vizcaino F, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU, Wieland B (2013) Introduction of African swine fever into the European Union through illegal importation of pork and pork products. *PLoS One* 8:e61104
6. Costard S, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU (2013) Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res* 173:191-197
7. Eble P, de Koeijer A, Bouma A, Stegeman A, Dekker A (2006) Quantification of within- and between-pen transmission of Foot-and-Mouth disease virus in pigs. *Vet Res* 37:647-654
8. Gabriel C, Blome S, Malogolovkin A, Parilov S, Kolbasov D, Teifke JP, Beer M (2011) Characterization of african Swine Fever virus caucasus isolate in European wild boars. *Emerg Infect Dis* 17:2342-2345
9. Giammarioli M, Gallardo C, Oggiano A, Iscaro C, Nieto R, Pellegrini C, Dei Giudici S, Arias M, De Mia GM (2011) Genetic characterisation of African swine fever viruses from recent and historical outbreaks in Sardinia (1978-2009). *Virus Genes* 42:377-387
10. Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, Kolbasov D (2013) African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res* 173:198-203
11. Greig A, Plowright W (1970) The excretion of two virulent strains of African swine fever virus by domestic pigs. *The Journal of hygiene* 68:673-682
12. Gulenkin VM, Korennoy FI, Karaulov AK, Dudnikov SA (2011) Cartographical analysis of African swine fever outbreaks in the territory of the Russian Federation and computer modeling of the basic reproduction ratio. *Prev Vet Med* 102:167-174

13. Howey EB, O'Donnell V, Ferreira HCdC, Borca MV, Arzt J (2013) Pathogenesis of highly virulent African swine fever virus in domestic pigs exposed via intraoropharyngeal, intranasopharyngeal, and intramuscular inoculation, and by direct contact with infected pigs. *Virus Res*:12
14. Khomenko S, Beltrán-Alcrudo D, Rozstalnyy A, Gogin A, Kolbasov D, Pinto J, Lubroth J, Martin V (2013) African swine fever in the Russian Federation: risk factors for Europe and beyond. *EMPRES Watch*.
15. King DP, Reid SM, Hutchings GH, Grierson SS, Wilkinson PJ, Dixon LK, Bastos AD, Drew TW (2003) Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* 107:53-61
16. Kleiboeker SB (2002) Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 18:431-451
17. Klinkenberg D, de Bree J, Laevens H, de Jong MC (2002) Within- and between-pen transmission of Classical Swine Fever Virus: a new method to estimate the basic reproduction ratio from transmission experiments. *Epidemiol Infect* 128:293-299
18. Laddomada A, Patta C, Oggiano A, Caccia A, Ruiu A, Cossu P, Firinu A (1994) Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: a serological survey of wild boar and comparison with African swine fever. *Vet Rec* 134:183-187
19. Malogolovkin A, Yelsukova A, Gallardo C, Tsybanov S, Kolbasov D (2012) Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet Microbiol* 158:415-419
20. McVicar JW, Mebus CA, Becker HN, Belden RC, Gibbs EP (1981) Induced African swine fever in feral pigs. *J Am Vet Med Assoc* 179:441-446
21. Mebus CA (1988) African swine fever. *Adv Virus Res* 35:251-269
22. Mur L, Martinez-Lopez B, Sanchez-Vizcaino JM (2012) Risk of African swine fever introduction into the European Union through transport-associated routes: returning trucks and waste from international ships and planes. *BMC Vet Res* 8:149
23. Penrith ML, Vosloo W (2009) Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J S Afr Vet Assoc* 80:58-62
24. Perez J, Fernandez AI, Sierra MA, Herraiz P, Fernandez A, Martin de las Mulas J (1998) Serological and immunohistochemical study of African swine fever in wild boar in Spain. *Vet Rec* 143:136-139

25. Rahimi P, Sohrabi A, Ashrafihelan J, Edalat R, Alamdari M, Masoudi M, Mostofi S, Azadmanesh K (2010) Emergence of African swine fever virus, northwestern Iran. *Emerg Infect Dis* 16:1946-1948
26. Rodriguez F, Fernandez A, Martin de las Mulas JP, Sierra MA, Jover A (1996) African swine fever: morphopathology of a viral haemorrhagic disease. *Vet Rec* 139:249-254
27. Rowlands RJM, V.; Heath, L.; Hutchings, G.; Oura, C.; Vosloo, W.; Dwarka, R.; Onashvili, T.; Albina, E.; Dixon, L.K. (2008) African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis*, CDC, pp 1870–1874
28. Ruiz-Fons F, Segales J, Gortazar C (2008) A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. *Vet J* 176:158-169
29. Sanchez-Vizcaino JM (2006) African swine fever. *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, pp 291-298
30. Takamatsu HD, L.K.; Alonso, C.; Escribano, J.M.; Martins, C.; Revilla, Y.; Salas, M.L. (2011) Asfarviridae. *Virus Taxonomy*, pp 153-162
31. Vynnycky E, White R (2010) *An Introduction to Infectious Disease Modelling*, 1 edn. Oxford University Press, New York

**4.1.2 Zur Situation der Afrikanischen Schweinepest und der biologischen
Charakterisierung aktueller Virusisolate**

Clinical signs and pathology of recent African swine fever virus isolates

Kerstin Tauscher, Jana Pietschmann, Kerstin Wernike, Jens P. Teifke, Martin Beer,
Sandra Blome

Korrespondenzadresse:

Dr. Sandra Blome

Institut für Virusdiagnostik

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Südufer 10

17493 Greifswald-Insel Riems

Sandra.Blome@fli.bund.de

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 2015

128, Heft 7/8

Zusammenfassung

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) ist eine bei der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) anzeigepflichtige Tierseuche, die mit schweren, unspezifischen Symptomen und einer hohen Mortalität einhergeht. Empfänglich für das gleichnamige DNA-Virus (ASPV) sind ausschließlich Haus- und Wildschweine sowie Zecken der Gattung *Ornithodoros*. Da es bislang keinen zugelassenen Impfstoff gibt, beruht die Bekämpfung ausschließlich auf strikten veterinärhygienischen Maßnahmen. Wichtigster Bestandteil dieser Maßnahmen ist eine frühzeitige Entdeckung einer Infektion in betroffenen Schweinebeständen und eine schnelle und zuverlässige Labordiagnose.

Infektionen mit aktuellen Virusisolaten aus Armenien, Sardinien, Litauen oder Kenia führen bei Haus- und Wildschweinen zu akuten Krankheitsverläufen, deren Kardinalsymptom sehr hohes Fieber ($> 41^{\circ}\text{C}$) ist. Begleitet wird dies von diversen unspezifischen Symptomen wie Lethargie, Inappetenz, Diarrhoe, respiratorischen Symptomen sowie einer erhöhten Blutungsneigung. In experimentellen Untersuchungen lag die Mortalität bei 100 %. Bei den durchgeführten pathologisch-anatomischen Untersuchungen wurden insbesondere ebenholzfarbene gastro-hepatische Lymphknoten, Lungenödeme, Petechien in der Nierenrinde und Gallenblasenwandödeme gefunden.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Seuchenlage mit einem endemischen Geschehen auf Sardinien und Ausbrüchen in Russland und mehreren östlichen EU-Mitgliedstaaten und dem damit verbundenen Risiko für die Einschleppung der ASP in weitere Staaten der EU, unter anderem auch Deutschland, sollten bei unspezifischer Klinik und Pathologie in Hausschweinebeständen geeignete Proben, wie Serum, EDTA-Blut und Milzmaterial differentialdiagnostisch auf ASP und klassische Schweinepest untersucht werden.

Schlüsselwörter: Afrikanische Schweinepest, klinische Symptome, pathologisch-anatomische Befunde, Diagnostik, experimentelle Infektion

Summary

African swine fever (ASF), a disease notifiable to the World Organization of Animal Health (OIE), is characterized by severe, unspecific clinical signs and high mortality rates. Hosts for ASF virus (ASFV) are only members of the family *Suidae* and soft ticks of the genus *Ornithodoros*. Currently, no vaccine is available and therefore, the control is primarily based on strict sanitary measures. The most important part is the early detection of the disease within affected animal holdings and the fast and reliable confirmation by laboratory diagnosis.

Infections of domestic pigs and European wild boar with recent Armenian, Sardinian, Lithuanian or Kenyan ASFV isolates lead to severe, acute disease courses with the predominant symptom of high fever ($> 41^{\circ}\text{C}$) accompanied by further unspecific clinical signs such as lethargy, loss of appetite, diarrhoea, respiratory symptoms, and an increased bleeding tendency. In experimental infection studies the mortality rate reached 100 %. The most prominent pathomorphological findings included ebony-colored gastrohepatic lymph nodes, lung oedema, petechiae in the renal cortex, and oedema of the gallbladder wall.

In the light of the current epidemiological situation with endemic ASFV infections on Sardinia and outbreaks in Russia and several Eastern EU Member States there is a risk for an introduction in further, previously unaffected EU countries including Germany. Hence, appropriate sample materials (serum, blood, spleen) of domestic pigs with unspecific clinical symptoms or pathomorphological findings should be examined for both ASFV and classical swine fever virus.

Key words: African swine fever, clinical picture, pathology, diagnosis, experimental infection

Einleitung

Die Afrikanische Schweinepest (ASP); engl.: *African swine fever* (ASF), ist eine hoch ansteckende Viruserkrankung mit verschiedenen Verlaufsformen, welche mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht und der internationalen Anzeigepflicht unterliegt (OIE). Sie betrifft Haus- und Wildschweine beider Geschlechter und aller Altersklassen gleichermaßen. Andere Haustierarten sowie der Mensch sind nicht empfänglich. Die Übertragung der ASP kann durch direkten Kontakt zu infizierten und erkrankten Tieren erfolgen, die das Virus mit allen Sekreten und Exkreten ausscheiden. Insbesondere der Kontakt zum Blut dieser Tiere stellt einen sehr effektiven Ansteckungsweg dar. Eine Verschleppung dieser Tierseuche ist häufig auf das Verfüttern virushaltiger Speiseabfälle zurückzuführen (Sanchez-Vizcaino et al., 2013). Erstes und oftmals einziges Kennzeichen für eine Infektion ist plötzlich auftretendes und anhaltendes hohes Fieber (häufig über 41°C) sowie respiratorische und gastrointestinale Symptome. Als pathologische Befunde stehen hauptsächlich virämisch-septikämische Veränderungen, wie hyperämische und hämorrhagisch geschwollene Lymphknoten, Petechien und Lungenödeme im Vordergrund. Anhand des klinischen und pathologisch-anatomischen Bildes der ASP kann diese nicht von der Klassischen Schweinepest (KSP) abgegrenzt werden.

Derzeit stehen weder ein wirksamer Impfstoff noch effektive Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung (Kleiboeker, 2002; Sanchez-Vizcaino et al., 2013). Aus diesem Grund richten sich alle Bekämpfungsmaßnahmen gegenwärtig auf die Eindämmung des Krankheitsgeschehens in betroffenen Regionen oder Ländern und die Verhinderung der Einschleppung des Erregers. Im Falle eines Ausbruchs in Deutschland wird die Bekämpfung dieser Tierseuche nach den Maßgaben der aktuell gültigen Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest (Anonym, 2003) durchgeführt. Erste Maßnahmen beinhalten die umgehende Keulung des betroffenen Tierbestandes und gegebenenfalls der Bestände der direkten Umgebung (1 km Radius), die Einrichtung von Restriktionszonen und die Beschränkungen von Handel und Transport. Im Hinblick auf das Auftreten weniger virulenter ASP-Virusstämme, die kein eindeutiges klassisches Krankheitsbild hervorrufen, besteht die Gefahr einer unbemerkten Ausbreitung der Tierseuche vor ihrer Identifizierung. Daher sind neben einer raschen Labordiagnostik auch Präventionsmaßnahmen, wie die Schulung der Jägerschaft, die Information der Tierärzte und Tierhalter sowie Warnhinweise die den Schiff- und Flugverkehr betreffen, notwendig. Das Verbot der Verfütterung von Speiseabfällen und die Zutrittsbeschränkung zu Schweinebeständen (Forderungen der Schweinehaltungshygieneverordnung) sind hierbei ebenso von größter Bedeutung. Angesichts

des aktuellen ASP-Ausbruchsgeschehens soll dieser Artikel einen Überblick über diese komplexe Tierseuche geben. Darüber hinaus werden die klinischen und pathologisch-anatomischen Befunde, die nach Infektion mit aktuellen ASPV-Isolaten zu erwarten sind, anhand tierexperimenteller Studien, die am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) durchgeführt wurden, erläutert.

Aktuelle Verbreitung der ASP

Die ASP wurde erstmals 1921 in Kenia beschrieben und ist in weiten Teilen Afrikas und auf Sardinien endemisch verbreitet (Montgomery, 1921; Laddomada et al., 1994; Penrith und Vosloo, 2009, Dixon et al., 2012). Für den Eintrag der Tierseuche in die EU werden neben dem weltweiten Reiseverkehr, virushaltige Lebensmittel und unsachgemäß entsorgte Speisereste aus den endemischen Gebieten verantwortlich gemacht (Mur et al., 2012). Seit 2007 werden ausgehend von Georgien über Russland, Armenien, Aserbaidshan, die Ukraine und Weißrussland ASP-Fälle dokumentiert (Gogin et al., 2013) (Abb. 1). Mit der Meldung, dass Anfang 2014 in Litauen nahe der Grenze zu Weißrussland bei Wildschweinen die Afrikanische Schweinepest diagnostiziert wurde, hat die Tierseuche nunmehr auch die Europäische Union (EU) erreicht. Mittlerweile wurden in Polen, Lettland und Estland in Grenznähe zu Weißrussland, weitere Ausbrüche der Afrikanischen Schweinepest bei Wildschweinen (Fallwild) und in nahegelegenen Hausschweinebeständen festgestellt. Somit droht eine unmittelbare Gefahr für weitere Mitgliedsstaaten der EU und damit auch für Deutschland. Eine Einschleppung brächte neben den Auswirkungen für die Tiere auch schwere wirtschaftliche Schäden mit sich.



Abb. 1: Ausbruchsgeschehen der ASP in der Kaukasusregion und Russland von Januar 2007 bis September 2014. Es zeichnet sich eine klare Tendenz zur Ausbreitung der ASP in nordische Regionen ab. Mit Lettland, Litauen, Estland und Polen sind nun auch Staaten der Europäischen Union betroffen. Die roten Kreise markieren bestätigte Ausbrüche im Hausschwein, rote Dreiecke bestätigte Fälle der ASP im Wildschwein. Grüne Markierungen zeigen Verdachtsfälle an, die nicht bestätigt wurden (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015, <http://empres-i.fao.org><<http://empres-i.fao.org>>. Reproduced with permission. The designations employed and the presentation of material in the map(s) do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of FAO concerning the legal or constitutional status of any country, territory or sea area, or concerning the delimitation of frontiers.).

Erreger

Das Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASPV) ist ein großes (ca. 200 nm), behülltes DNA-Virus und gehört zum Genus *Asfivirus*, dem einzigen Vertreter der Familie *Asfarviridae* (ASFAR, **A**frican **S**wine **F**ever **A**nd **R**elated **V**iruses) (Dixon et al., 2012). Es besitzt eine doppelsträngige, nicht segmentierte DNA, die für mehr als 54 Struktur- und zahlreiche Nichtstrukturproteine kodiert, die u.a. die Immunantwort der Schweine modulieren. Bislang wurden, basierend auf der partiellen Sequenzierung des B646L Gens (kodierend für das Hauptkapsidprotein p72), 22 Genotypen des ASP-Virus klassifiziert (Bastos et al., 2003), die geographisch unterschiedlich verteilt sind und keine oder nur eine limitierte Kreuzimmunität untereinander zeigen. Das Virus zählt zu den Arboviren (*arthropod-borne viruses*). Lederzecken der Gattung *Ornithodoros* dienen als Vektoren der Viruserkrankung und können

den Erreger viele Jahre in sich beherbergen sowie in einem silvatischen Zyklus übertragen (Parker et al., 1969; Kleiboeker und Scoles, 2001; Costard et al., 2013). Diese Lederzecken kommen insbesondere auf dem afrikanischen Kontinent und im Mittelmeerraum vor. Natürliche Wirte der ASP sind die in Afrika heimischen Warzenschweine und Buschschweine, die sich infizieren jedoch nicht klinisch erkranken und ein weiteres natürliches Reservoir für den Erreger bilden (Plowright et al., 1994; Anderson et al., 1998). Durch eine Blutmahlzeit auf infizierten Warzenschweinen nehmen die Zecken (*O. moubata*) das ASPV auf und geben dieses an Eier und Nymphenstadien weiter. Diese volle Vektorkompetenz besitzen die auf der iberischen Halbinsel in die Epidemiologie der ASP involvierten *O. erraticus* Zecken nicht. Diese können das Virus nur über die Stadien, nicht aber über Eier weitergeben (Endris and Hess 1994). In Ländern Mitteleuropas spielt die Zecke für die Epidemiologie der ASP offenbar keine Rolle. Den Haupteintragsweg des Virus in die Hausschweinpopulation stellt insbesondere der direkte Kontakt zu infizierten Tieren und deren Produkten dar. Die effizienteste Übertragung erfolgt durch das Blut dieser Tiere. Die Kontagiosität der Erkrankung ist hoch, wenn Blut bzw. bluthaltige Se- oder Exkrete im Spiel sind, kann jedoch auch moderat sein, wenn der Blutkontakt fehlt. ASFV besitzt kein zoonotisches Potential. Das Virus besitzt eine außerordentlich hohe Tenazität. Eine Hitzeinaktivierung des Virus findet erst bei Temperaturen ab 56°C nach 70 bzw. ab 60°C nach 20 minütiger Haltezeit statt (Fernández und White, 2010; Dixon et al., 2012). Das Virus ist im Schlachtkörper über sieben Monate (4-8°C) und in Gefrierfleisch über Jahre nachweisbar (Sánchez-Vizcaíno et al., 2009). Ferner bleibt das Virus im Kot unter günstigen Bedingungen über 60 Tage infektiös.

Als verlässlich wirksame Desinfektionsmittel werden Natriumhydroxid, Hypochlorit, Formalin und jodhaltige Substanzen empfohlen (OIE, 2008). In Deutschland ist laut Desinfektionsmittelliste der DVG VENNO® VET zur Desinfektion zugelassen.

Labordiagnostik

Die Diagnose eines ASP-Infektionsgeschehens und damit sichere Abgrenzung zu anderen Erkrankungen erfolgt ausschließlich durch die labordiagnostische Untersuchung. In der amtlichen Methodensammlung sind die in Deutschland anzuwendenden diagnostischen Methoden aufgeführt. Sie umfasst direkte und indirekte Nachweismethoden. Das Nationale Referenzlabor für Afrikanische Schweinepest am FLI führt die Diagnostik im Ausbruchsfall durch, da für den Umgang mit dem Erreger ein hoher Biosicherheitsstandard unter L3+-Bedingungen notwendig wird. Den Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer steht für

die Ausschlussdiagnostik/Differentialdiagnostik der ASP seit 2011 eine spezifische Polymerasekettenreaktion (real-time PCR) zur Verfügung.

Routinemäßig erfolgt am FLI der Virusnachweis mittels real-time PCR (King et al., 2003; Tignon et al., 2011). Als Bestätigungstest und für weitere Untersuchungen an dem Isolat wird ein Hämadsorptionstest auf primären Blutmonozyten durchgeführt (Carrascosa et al., 2011). In diesem Test nutzt man das von infizierten Zellen ausgelöste Hämadsorptionsphänomen, d.h. Erythrozyten lagern sich an infizierte Makrophagen an (Malmquist und Hay, 1960). Da kein anderes Virus der Schweine zu diesem Phänomen führt, ist der Test spezifisch für ASPV. Diese Methode ist allerdings aufgrund des Zeitbedarfes (mindestens zehn Tage) und des Arbeitsaufwandes nicht für Massenuntersuchungen geeignet. Darüber hinaus lösen nicht alle Isolate eine Hämadsorption aus. Im Einzelfall können zudem Immunfluoreszenzfärbungen an Organschnitten bzw. Antigen-ELISAs durchgeführt werden. Die serologische Untersuchung zum Nachweis von Antikörpern erfolgt am FLI mittels kommerziell erhältlicher ELISAs, die Bestätigung erfolgt mittels Immunperoxidasetest (Gallardo et al., 2013). Für die Diagnostik in einem Ausbruchsfall sind den Untersuchungsämtern in erster Linie Serum- und Milzproben einzusenden. Als weitere Proben eignen sich EDTA-Blut, Lymphknoten und Tonsille. Für die zurzeit durchgeführte passive Überwachung des Fallwilds in Deutschland können mit blutigen Körperflüssigkeiten getränkte Tupfer verwendet werden (Petrov et al., 2014).

Klinische Symptomatik

Die Afrikanische Schweinepest weist ein sehr variables klinisches Bild auf, das von unspezifischen Symptomen bis hin zu hämorrhagischem Fieber bei Haus- und Wildschweinen reicht (Dixon et al., 2012) (Abb. 2). Dadurch bedingt lässt sie sich nicht sicher von dem der Klassischen Schweinepest und anderer schwerer Allgemeinerkrankungen beim Schwein abgrenzen. Differentialdiagnostisch müssen demzufolge eine Vielzahl anderer Erkrankungen ausgeschlossen werden. Von differentialdiagnostischer Bedeutung sind neben der Klassischen Schweinepest auch Rotlauf, Aujeszky'sche Krankheit, das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom sowie bakterielle Septikämien verursacht durch Salmonellen und Pasteurellen, die Glässersche Krankheit, Thrombozytopenische Purpura und Kumarin- und Kochsalzvergiftungen (Kleiboeker, 2002). Ein Verdacht auf ASP liegt vor, wenn die klinischen Symptome und/oder pathologisch-anatomischen Untersuchungsergebnisse einen Seuchenausbruch befürchten lassen. Ein frühzeitiger Ausschluss der ASP ist daher zwingend notwendig.

Die Inkubationszeit beträgt gewöhnlich drei bis 15 Tage, bei akutem Verlauf drei bis vier Tage (Kleiboeker, 2002; Fernández und White, 2010). Es lassen sich perakute, akute, subklinische und chronische Verlaufsformen unterscheiden, die vom Adaptationsgrad des Virus an das Schwein, dem Immunstatus des Tieres, dem Expositionsweg und der Expositionsdosis abhängen (Sanchez-Vizcaino, 1999; Kleiboeker, 2002). Das Alter zum Zeitpunkt der Infektion hat, wenn überhaupt, nur marginal Einfluss auf den klinischen Verlauf, vielmehr ist die Virulenz des Isolats entscheidend. Beschrieben werden für hochvirulente ASPV-Isolate perakute Krankheitsverläufe bei denen die Tiere innerhalb von ein bis drei Tagen nach Einsetzen von hohem Fieber (41–42 °C) plötzlich versterben (Moennig, 2003; Fernández und White, 2010). Bei akuten Krankheitsverläufen mit Mortalitätsraten von annähernd 100% tritt der Tod innerhalb von sieben bis zehn Tagen nach Auftreten von hohem Fieber, Anorexie, Inkoordinationen, Zyanosen und respiratorischen sowie gastrointestinalen Symptomen ein (Kleiboeker, 2002). Subakute und chronische Krankheitsverläufe können durch moderat virulente Stämme verursacht werden. Infizierte Tiere zeigen weniger schwere und variierende klinische Symptome, wie leichtes Fieber, Gewichtsverlust, Hautveränderungen und respiratorische Symptome die sich über mehrere Wochen bis Monate entwickeln. Die Mortalitätsrate wird mit 30 bis 70% angegeben (Kleiboeker, 2002; Fernández und White, 2010).

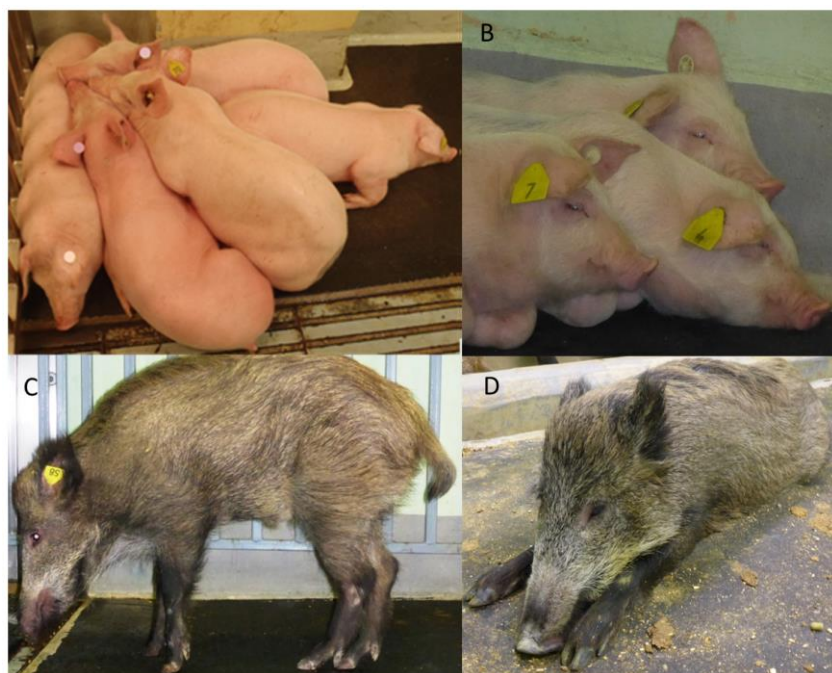


Abb. 2: Unspezifische Allgemeinsymptome bei Haus- und Wildschweinen nach Infektion mit einem hochvirulenten ASPV-Stamm.

Pathologie

Bei der Sektion infizierter Tiere fällt, je nach Schwere des Krankheitsverlaufs, eine Vielzahl an pathologisch-anatomischen Befunden auf. Diese betreffen insbesondere Lymphknoten, Lunge, Niere und Milz. Nach Infektionen mit hochvirulenten ASPV-Stämmen werden hauptsächlich alveoläre und interstitielle Lungenödeme, hyperämische und hämorrhagisch-geschwollene Lymphknoten, Splenomegalie, Ödeme und Blutungen des Gallenblasenbettes sowie Petechien der Nierenrinde beschrieben (Sanchez-Vizcaino, 1999). Moderat virulente Stämme verursachen hingegen eine subakute Form der ASP. Als charakteristische Organläsionen werden vergleichbare Veränderungen, wie sie nach Infektion mit hochvirulenten ASPV-Stämmen auftreten, genannt (Mebus, 1988; Sanchez-Vizcaino, 1999). Lediglich die Milz ist weniger häufig betroffen (Mebus, 1988). Die chronische Form der ASP zeichnet sich durch eine Vielzahl von Veränderungen aus, die auch auf Sekundärinfektionen zurückzuführen sind. Beschrieben werden fibrinöse Perikarditis und Pleuritis, interstitielle Pneumonien, Hyperplasien der Lymphknoten, Hepatitis, Meningoenzephalitis sowie Hautnekrosen (Moulton und Coggins, 1968).

Experimentelle Studien mit aktuellen ASPV-Isolaten

Am FLI wird intensiv an der Erforschung dieser Tierseuche und der Entwicklung eines geeigneten Impfstoffs gearbeitet. Zu den derzeitigen Forschungsschwerpunkten gehört die Erfassung klinischer und immunologischer Parameter sowie pathologischer Veränderungen an Haus- und Wildschweinen nach Infektion mit ASPV-Isolaten verschiedener Genotypen und Virulenz. Im Hinblick auf die aktuelle Seuchensituation wurden insbesondere zwei vorab als hochvirulent eingestufte Isolate des Genotyps I (Sardinien) und II (Osteuropa [Armenien und Litauen]) sowie ein als moderat virulent eingestuftes Virus des Genotyps X (Kenia) verwendet. Die Infektion mit den Isolaten aus Osteuropa erfolgte sowohl bei Haus- als auch Wildschweinen auf dem oronasalen oder intramuskulären Weg. Dagegen wurde das Isolat aus Sardinien Wildschweinen und das kenianische Isolat Hausschweinen ausschließlich intramuskulär injiziert. Die Infektionsdosis betrug zwischen 3 und 10^6 hämagglutinierende Einheiten pro ml Zellkulturüberstand bzw. Milzanrieb (HAU/ml). Um die klinischen Symptome in den Versuchen objektiv beurteilen zu können, wurde ein international harmonisiertes klinisches Bewertungsschema (engl. *clinical score*, CS) verwendet. Im Detail wurden für die Parameter Temperatur, Anorexie, Lebhaftigkeit/Verhalten, Hautveränderungen, Gelenkschwellungen, Atmung, Augenausfluss, Verdauung und neurologische Symptome in Abhängigkeit von der Ausprägung und dem Schweregrad der

Symptome, Punkte von 0 bis 6 vergeben. Die Summe dieser Punkte wird als *clinical score* (CS) bezeichnet (Tab. 1).

Klinische Befunde

Die experimentellen Untersuchungen mit unterschiedlich virulenten ASPV-Genotypen ergaben eine kurze Inkubationszeit, da bereits ab dem vierten Tag nach Infektion erste Tiere verstarben bzw. auf Grund schwerwiegender ASPV-assoziierten Symptome euthanasiert werden mussten (Tab. 1). Hohes Fieber zwischen 41,4°C und 41,9°C stellte in allen Versuchen das erste und oftmals einzige eindeutige klinische Anzeichen für eine ASP-Infektion dar (Tab. 1). Die weiteren Symptome waren unspezifisch und umfassten Inappetenz, Konjunktivitis (Abb. 3A), Lethargie, zyanotische Veränderungen an den Ohren (Abb. 3B), respiratorische Beschwerden und eine erhöhte Blutungsneigung. In wenigen Fällen kamen die Tiere zum Festliegen, zeigten Ruderbewegungen und verstarben perakut. Nach Infektion von Haus- und Wildschweinen mit dem hochvirulenten osteuropäischen ASPV-Genotyp zeigten sich akute bis perakute Krankheitsverläufe (Gabriel et al., 2011; Blome et al., 2012) mit unspezifischen Symptomen, einer 100% Mortalitätsrate nach vier bis elf Tagen und maximalen CS-Werten von 19. Ein vergleichender Versuch mit einem sardischen Isolat aus dem Jahr 2008 in Wildschweinen zeigte ein ähnliches klinisches Bild, wobei die respiratorischen Symptome neben dem Fieber am meisten hervorstachen. Diese Tiere erreichten einen maximalen CS von 16. Auch hier lag die Mortalitätsrate bei 100% nach fünf bis acht Tagen. Im Gegensatz hierzu erreichten Hausschweine, die mit einem kenianischen Isolat infiziert wurden, CS-Werte von 23. Bei diesen Tieren überwog, neben dem hohen Fieber, die erhöhte Blutungsneigung. Sie verstarben akut nach acht bis 14 Tagen (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht zum Infektionsverlauf nach Infektion mit verschiedenen ASPV – Isolaten

Isolat		Genotyp	Tierzahl und -art	Dosis (HAU/ml)	Infektions -weg	Überlebenszeit nach Infektion (in Tagen)	maximal CS	maximale Körpertemperatur
Osteuropa	Armenien	II	15 WS/ 15 HS	<10	oronasal	4-11*	18 Punkte (10 dpi)	41,8°C (7 dpi)
	Litauen	II	5 HS	10 ^{3,5}	i.m.	4-6	19 Punkte (6 dpi)	41,4°C (5 dpi)
Sardinien		I	4 WS	10 ⁶	i.m.	5-8	16 Punkte (8 dpi)	41,7°C (4 dpi)
Kenia		X	6 HS	10 ¹	i.m.	8-14	23 Punkte (14 dpi)	41,9°C (11 dpi)
Kenia		X	3 HS	<10	i.m.	11	20 Punkte (11 dpi)	41,5°C (5 dpi)

HAU/ml – hämagglutinierende Einheiten pro ml; CS - clinical score; WS - Wildschwein; HS - Hausschwein; dpi - days post infection (Tage nach Infektion); i.m. – intramuskulär; * - Infektionszeitpunkt wurde anhand der Fieberkurven zurück gerechnet

Pathologische Befunde

Im Verlauf der am FLI erfolgten Infektionsstudien an Haus- und Wildschweinen mit verschiedenen virulenten ASPV-Isolaten wurden umfangreiche Befunde erhoben. Bei der ASP steht das Bild einer virämisch-septikämischen Erkrankung mit Hämorrhagien im Vordergrund. Am häufigsten betroffen waren die Lymphknoten. Erwartungsgemäß wiesen, bis auf wenige Ausnahmen, fast alle infizierten Tiere vergrößerte hämorrhagische Lymphknoten auf. Am eindrucksvollsten waren die gastro-hepatischen und renalen Lymphknoten verändert (Abb. 4A), die häufig ebenholzfarben hervor traten. Weiterhin betroffen waren die Mandibularlymphknoten, die inguinalen Lymphknoten sowie die Darmlymphknoten (Abb. 4C). Darüber hinaus zeigten sich bei nahezu allen Tieren unterschiedlich stark ausgeprägte alveoläre und interstitielle Lungenödeme oftmals mit einer Ansammlung von feinblasigem teils blutigem Schaum in der Trachea (Abb. 4I und 4H). Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten waren nicht feststellbar. Diese Befunde spiegelten die bei vielen Tieren dokumentierten respiratorischen Symptome wider. Ein Großteil der Tiere wies unterschiedlich stark ausgeprägte Petechien in der Nierenrinde auf (Abb. 4G). Vereinzelt waren perirenale teils in das Nierenbecken hineinziehende Ödeme vorhanden. Bei einer Vielzahl von Tieren, aber vor allem nach Infektion mit dem hochvirulenten ASPV-Isolat aus Sardinien wurde eine verstärkte Läppchenzeichnung der Leber festgestellt. Zudem wurden zum Teil hochgradige ödematöse Veränderungen der Gallenblasenwand und des Gallenblasenbettes, nicht selten mit Blutungen kombiniert, beobachtet (Abb. 4D). Diese Veränderungen traten vor allem gehäuft bei Tieren nach Infektion mit dem kenianischen ASPV-Isolat auf. Weiterhin waren gehäuft hämorrhagisch nekrotisierende Gastritiden und an verschiedenen Lokalisationen des gesamten Darmtrakts auftretende Blutungen sowie entzündliche Veränderungen nachweisbar. Die als pathognomonisch für die Klassische Schweinepest geltenden Milzrandinfarkte wurden nicht und eine Splenomegalie nur selten und unterschiedlich stark ausgeprägt beobachtet (Abb. 4B). Des Weiteren sind an dieser Stelle vereinzelt aufgetretene Schleimhautblutungen in der Harnblase (Abb. 4E), punktförmige Blutungen der Tonsille (Abb. 4F) und Hämohydroperitoneum zu nennen. Bei weniger akut ausgeprägten Krankheitsverläufen zeigten sich häufig für ASP unspezifische Veränderungen wie Arthritiden, Abszesse in den Gelenken und der Haut sowie Pneumonien, verursacht durch bakterielle Sekundärinfektionen. Innerhalb der Versuchstiergruppen wies eine große Anzahl von Tieren nur wenige oder keine pathologische Befunde auf, wobei der Virusnachweis auch bei diesen Tieren stets zuverlässig gelang. Das Fehlen der beschriebenen Veränderungen schließt somit eine ASP-Infektion nicht

aus. In Abhängigkeit vom eingesetzten ASPV-Isolat zeigte sich nur eine geringe Variabilität in der Schwere der Organläsionen, wobei tendenziell das kenianische Isolat die stärksten Organveränderungen verursachte (Abb. 5). Eine vergleichende Aussage dazu wird allerdings dadurch erschwert, dass die Tierzahlen nicht unerheblich voneinander abwichen (Tab. 1).

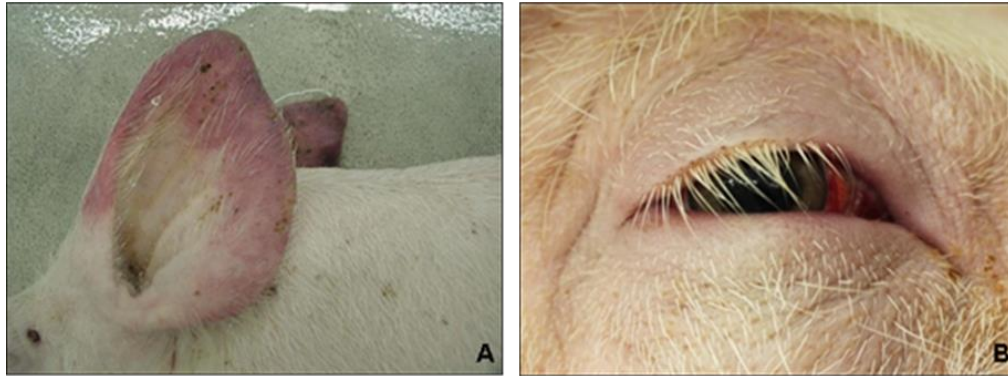


Abb. 3: Zyanotische Hautverfärbungen im Bereich der Ohren (A) und hochgradige Konjunktivitis (B) beim Hausschwein nach Infektion mit dem armenischen ASPV-Isolat.

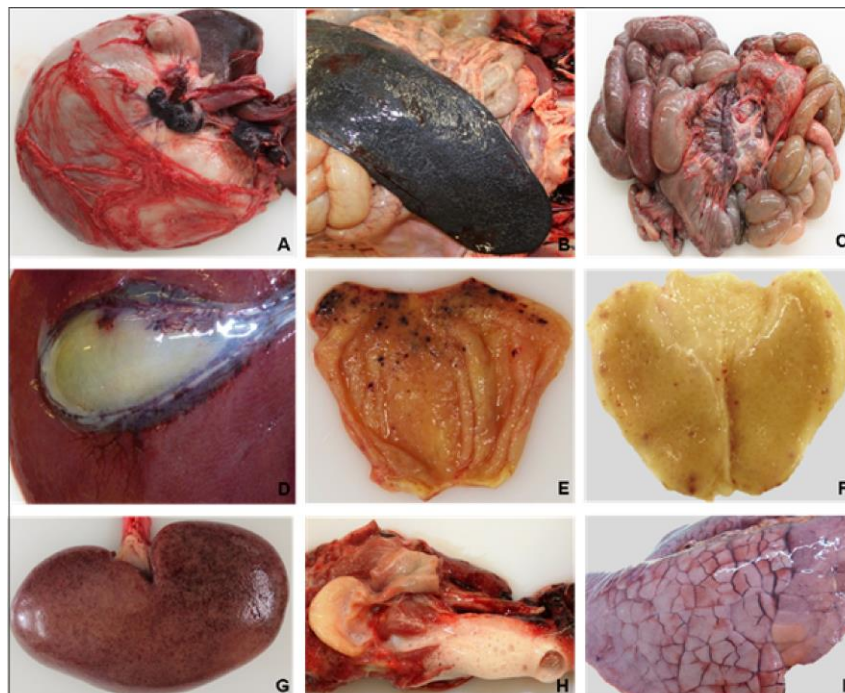


Abb. 4: Organläsionen bei Haus- und Wildschweinen nach Infektion mit verschiedenen ASPV-Isolaten. (A) vergrößerte hämorrhagisch veränderte Magen- und Leberlymphknoten, (B) vergrößerte, brüchige hämorrhagisch veränderte Milz (Splenomegalie), (C) vergrößerte hämorrhagisch veränderte Darmlymphknoten, (D) ödematöse Gallenblasenwand mit Hämorrhagien, (E) Petechien in der Harnblasenschleimhaut, (F) Tonsille mit punktförmigen Blutungen, (G) Petechien in der Nierenrinde, (H) Trachea gefüllt mit feinblasigem Schaum, (I) interstitielles Lungenödem.

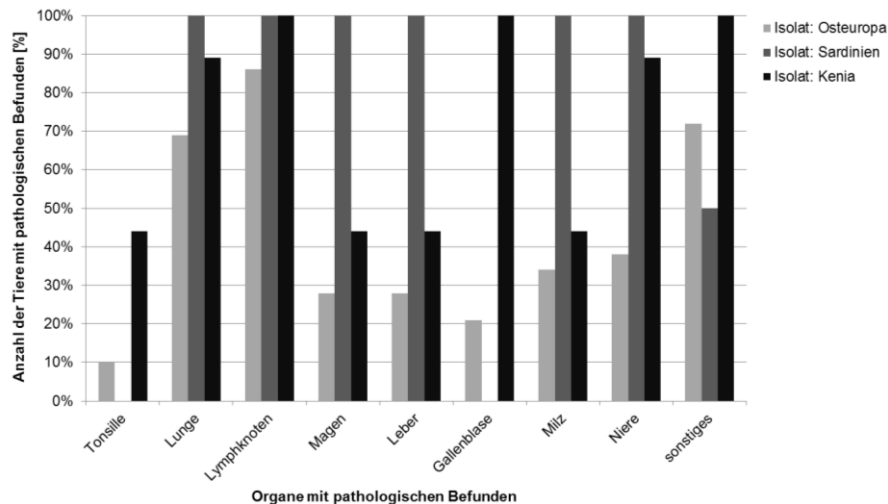


Abb. 5: Verteilung von Organläsionen bei Haus- und Wildschweinen nach Infektion mit drei hochvirulenten ASPV-Isolaten. Sonstiges = verminderte Blutgerinnung, Kümmererhabitus, Aszites.

Fazit

Die Afrikanische Schweinepest stellt für den Haus- und Wildschweinebestand in Europa eine ernstzunehmende Bedrohung dar, die nur durch strikte Einhaltung von Bekämpfungs- und Verhütungsmaßnahmen eingedämmt werden kann. Hochvirulente, aber auch moderat virulente ASPV-Stämme, verursachen eine variierende und oftmals unspezifische Klinik bei Haus- und Wildschweinen. Die vorab für das sardische ASPV-Isolat angenommene hohe Virulenz konnte durch die Untersuchungen des FLI bestätigt werden. Im Vergleich dazu erwiesen sich die osteuropäischen Isolate, auch über die Zeit betrachtet (2008 bzw. 2014), ebenfalls als hoch virulent. Die moderate Virulenz des kenianischen Isolats konnte unter experimentellen Bedingungen nicht bestätigt werden. Bei diesem ASPV-Isolat zeigten sich neben einer hochgradigen Klinik ausgeprägte pathologische Befunde, wobei die Erkrankungsdauer etwas länger war.

Die pathologisch-anatomischen Kardinalbefunde wie hämorrhagisch veränderte Lymphknoten vor allem im gastrohepatischen Bereich sind kennzeichnend für eine Infektion mit dem ASPV. Diese klassischen Veränderungen können aber auch fehlen, daher ist eine umgehende labordiagnostische Abklärung von Verdachtsfällen durch PCR-Untersuchungen zwingend notwendig, um eine weitere Ausbreitung der Afrikanischen Schweinepest in Europa zu verhindern und eine Differenzierung von der Klassischen Schweinepest und anderen Infektionen vorzunehmen.

Conflict of interest

Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die im oben genannten Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

- Anonym (2003):** Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest (Schweinepestverordnung). Bekanntmachung der Neufassung vom 24. Juli 2003. BGBl. I, Nr. 37, S. 1496–1511.
- Anderson EC, Hutchings GH, Mukarati N, Wilkinson PJ (1998):** African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Vet Microbiol* 62: 1–15.
- Bastos AD, Penrith ML, Cruciare C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann E, Thomson G (2003):** Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol* 148: 693–706.
- Blome S, Gabriel C, Dietze K, Breithaupt A, Beer M (2012):** High virulence of African swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerg Infect Dis* 18: 708.
- Carrascosa AL, Bustos MJ, de Leon P (2011):** Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 26: Unit 26 14.*
- Costard S, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU (2013):** Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res* 173: 191–197.
- Dixon LK, Alonso C, Escribano JM, Martins C, Revilla Y, Salas ML, Takamatsu H (2012):** Family – Asfarviridae. *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses ; ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / ed by King, A, Lefkowitz, E, Adams M J and Carstens, E B – 9th ed - Amsterdam, Elsevier* 153–162.
- Endris RG, Hess WR (1994):** Attempted transovarial and venereal transmission of African swine fever virus by the Iberian soft tick *Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae). *J Med Entomol* 31: 373–381.
- Fernández PJ, White WR (2010):** Atlas of Transboundary Animal Diseases. . OIE (World Organisation for Animal Health) 20–29.
- Gabriel C, Blome S, Malogolovkin A, Parilov S, Kolbasov D, Teifke JP, Beer M (2011):** Characterization of african Swine Fever virus caucasus isolate in European wild boars.

Emerg Infect Dis 17: 2342–2345.

Gallardo C, Soler A, Nieto R, Carrascosa AL, De Mia GM, Bishop RP, Martins C, Fasina FO, Couacy-Hymman E, Heath L, Pelayo V, Martin E, Simon A, Martin R, Okurut AR, Lekolol I, Okoth E, Arias M (2013): Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests. *Vet Microbiol* 162: 32–43.

Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, Kolbasov D (2013): African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res* 173: 198–203.

King DP, Reid SM, Hutchings GH, Grierson SS, Wilkinson PJ, Dixon LK, Bastos AD, Drew TW (2003): Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* 107: 53–61.

Kleiboeker SB (2002): Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 18: 431–451.

Kleiboeker SB, Scoles GA (2001): Pathogenesis of African swine fever virus in *Ornithodoros* ticks. *Anim Health Res Rev* 2: 121–128.

Laddomada A, Patta C, Oggiano A, Caccia A, Ruiiu A, Cossu P, Firinu A (1994): Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: a serological survey of wild boar and comparison with African swine fever. *Vet Rec* 134: 183–187.

Malmquist WA, Hay D (1960): Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am J Vet Res* 21: 104–108.

Mebus CA (1988): African swine fever. *Advances in virus research* 35: 251–269.

Moennig V (2003): Afrikanische Schweinepest (ASP). In Liess, B, Kaaden, O R (Hrsg) *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren* Schlütersche, Hannover 69–71.

Montgomery RE (1921): On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J Comp Pathol* 34: 159–191, 243–262.

Moulton J, Coggins L (1968): Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. *The Cornell veterinarian* 58: 364–388.

Mur L, Martinez-Lopez B, Sanchez-Vizcaino JM (2012): Risk of African swine fever introduction into the European Union through transport-associated routes: returning trucks and waste from international ships and planes. *BMC Vet Res* 8: 149.

OIE (2008): *African swine fever*. In: Health WOFA (ed.), *Manual of Diagnostic Tests and*

Vaccines for Terrestrial Animals. Off Int Epiz, Paris, p. 1069–1082.

Parker J, Plowright W, Pierce MA (1969): The epizootiology of African swine fever in Africa. *Vet Rec* 85: 668–674.

Penrith ML, Vosloo W (2009): Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J S Afr Vet Assoc* 80: 58–62.

Petrov A, Schotte U, Pietschmann J, Dräger C, Beer M, Anheyer-Behmenburg H, Goller KV, Blome S (2014): Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar. *Vet Microbiol* 173: 360–365.

Plowright W, Thomson GR, Neser JA (1994): African swine fever. In: Coetzer, J A W, Thomson, G R, Tustin, R C *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa* Cape Town: Oxford University Press 568–599.

Sanchez-Vizcaino JM (1999): African swine fever. In Straw, B E, D Allaire, S, Mengeling, W L et al editors *Disease of swine* 8th edition Ames: Iowa State University Press 93–102.

Sánchez-Vizcaíno JM, Martínez-López B, Martínez-Avilés M, Martins C, Boinas F, Vial L, Michaud V, Jori F, Etter E, Albina E, Roger F (2009): Scientific review on African Swine Fever; EFSA Scientific Report: 1-141.

Sanchez-Vizcaino JM, Mur L, Martinez-Lopez B (2013): African swine fever (ASF): five years around Europe. *Vet Microbiol* 165: 45–50.

Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, De Mia GM, Le Potier MF, Bishop RP, Arias M, Koenen F (2011): Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J Virol Methods* 178: 161–170.

4.2 Überwachungs- und Bekämpfungsstrategien

4.2.1 Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar

Anja Petrov¹, Ulrich Schotte², Jana Pietschmann¹, Carolin Dräger¹, Martin Beer¹,
Helena Anheyer-Behmenburg², Katja Goller¹, and Sandra Blome^{1*}

¹ Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Germany

² Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Abteilung II, Veterinärmedizin, Kopperpahler Allee 120, 24119 Kronshagen, Germany

Corresponding author:

Dr. Sandra Blome

Friedrich-Loeffler-Institut

Institute of Diagnostic Virology

Suedufer 10

17493 Greifswald - Insel Riems

Phone: +49-38351-71144; Fax: +49-38351-71275

Email: sandra.blome@fli.bund.de

Veterinary Microbiology, 2014

173 (3–4), 360–365

Abstract

In view of the fact that African swine fever (ASF) was recently introduced into the wild boar population of the European Union and that classical swine fever (CSF) keeps reoccurring, targeted surveillance is of utmost importance for early detection. Introduction of both diseases is usually accompanied by an increased occurrence of animals found dead. Thus, fallen wild boar are the main target for passive surveillance. However, encouraging reporting by hunters and sampling of these animals is difficult. Partly, these problems could be solved by providing a pragmatic sampling approach. For this reason, we assessed the applicability of three different dry/semi-dry blood swabs, namely a cotton swab, a flocked swab, and a forensic livestock swab, for molecular swine fever diagnosis. After nucleic acid extraction using manual and automated systems, routine quantitative real-time polymerase chain reactions (qPCR) were carried out. Results obtained from swabs or their fragments were compared to results generated from EDTA blood.

It was shown that reliable detection of both pathogens was possible by qPCR. Shifts in genome copy numbers were observed, but they did not change the qualitative results. In general, all swabs were suitable, but the forensic swab showed slight advantages, especially in terms of cutting and further storage. Robustness of the method was confirmed by the fact that different extraction methods and protocols as well as storage at room temperature did not have an influence on the final outcome. Taken together, swab samples could be recommended as a pragmatic approach to sample fallen wild boar.

Keywords: Passive surveillance, wild boar, swine fever, alternative sampling, swabs

1. Introduction

Both African and classical swine fever are among the most important and devastating viral diseases of domestic pigs and wild boar (Edwards et al., 2000, Sanchez-Vizcaino et al., 2013) and are notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE). Recently, African swine fever (ASF) was introduced into the wild boar population of the European Union (EU), but also classical swine fever (CSF) keeps reoccurring (WAHID interface, visited May 10th 2014). As was observed with classical swine fever (CSF), disease occurrence in the wild boar population is often accompanied by spill over into the domestic pig population (Fritzemeier et al., 2000), with severe socio-economic consequences. Similar pattern were recently seen with African swine fever (ASF) that was also transmitted from wild boar to domestic pigs and back (Gogin et al., 2013). Only timely detection and intervention can lower the impact on both pig industry and wildlife and therefore, appropriate surveillance and warning systems are needed for countries at risk (De la Torre et al., 2013).

As introduction of both diseases into a naïve wild boar population is usually accompanied by high morbidity and mortality (Costard et al., 2013, Artois et al., 2002), and thus an increased occurrence of animals found dead, passive surveillance is crucial. However, the number of sample submissions from fallen wild boar is usually very low, even in times of increased risk. This could be partly due to the fact that sampling and/or transport of wild boar carcasses in various stages of decay is difficult and in some cases even nauseating. Thus, encouraging hunters to report and sample fallen wild boar could be facilitated by provision of an easy to handle and pragmatic sampling and transport approach.

In the presented pilot study, dry blood swabs were investigated. To this means, different swabs were immersed in EDTA blood samples from experimentally infected wild boar and domestic pigs and subsequently subjected to molecular swine fever diagnosis using different nucleic acid extraction methods and specific quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) techniques. Preparatory methods were chosen to allow detection of both diseases at the same time. Additional samples were tested to assess field applicability and transferability to other sample matrices including organ swabs.

2. Materials and methods

2.1. Swabs

Three different swabs, namely a routine cotton swab (COPAN), a flocked swab (FLOQSwabs, COPAN), and a forensic livestock swab (Genotube, Prionics) were used.

2.2 Processing and testing of samples

As a first proof of concept experiment, the above mentioned cotton swabs were immersed in EDTA blood samples from experimentally infected animals (n=7 for ASF, collected at 4 dpi; n=11 for CSF, collected at 4, 5, 7, 10 dpi). Samples were chosen to represent animals in the clinical phase of infection and had been stored at -70°C until further use. The resulting blood swabs were stored three days (ASF) or over night (CSF) at room temperature to mimic sample transport without cooling. For nucleic acid extraction, swabs were dipped into the AVL buffer of the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and used to stir it. After removal of the swab, all subsequent extraction steps were carried out according to the manufacturers instructions. A slight modification concerned the addition of an internal control DNA/RNA (5 µl per reaction with 2×10^5 copies per µl). Subsequently, qPCR or reverse transcription qPCR (RT-qPCR) was performed according to the protocols published by King et al.(2003) for ASF, and Hoffmann et al. (2005) for CSF. The PCR reactions were carried out using a Bio-Rad CFX Cycler (Bio-Rad Laboratories) and its accompanying software. Results were presented in a semi-quantitative way as quantification cycle (cq) values.

In a second pilot experiment, three different swabs (cotton, flocked and forensic) were used along with one manual and one automated nucleic acid extraction system. This time, swab fragments were subjected to nucleic acid extraction to ensure a retesting option.

For ASF, 10 samples from wild boar experimentally infected with ASF virus “Armenia08” (including samples from 6, 8 and 9 dpi) were used to soak the above mentioned swabs in parallel. After storage over night at room temperature, small fragments (about pinhead sized) were cut from the swabs with sterile scissors and used to extract nucleic acids through either the manual QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) or the automated EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen) with slight modifications (modification details are available from the authors upon request). For CSF, 5 samples from animals infected with CSFV strains recently isolated in Israel (“CSF01047”, 2009, genotype 2.1) and Germany (“CSF1045”, 2009, genotype 2.3) were subjected to the protocol described above. Downstream handling was done as in the pilot trial, but here, a dilution series of a synthetic standard with known copy numbers was

used to quantify genome copies in the respective samples. Results were compared among the different swabs and extraction methods, and with results from EDTA blood samples (pre-existing data from the respective animal trials or parallel extractions).

Based on the results of the two pilot experiments, additional Genotube samples were tested for both ASF (n=30) and CSF (n=19). The parental blood samples were tested in parallel. The samples were chosen from the clinical phase of infection from both domestic pigs and wild boar. The CSFV panel included in addition a dilution series of a strong positive blood sample (1:2 to 1:1024) to assess the dose response. Here, pinhead-sized swab fragments were used for nucleic acid extraction using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) after 24 h storage at room temperature. All samples were subsequently tested in the above mentioned PCR systems, and results were presented in a semi-quantitative way as quantification cycle (cq) values. In addition, flexibility and robustness were assessed through the inclusion of Genotube organ swabs. These swabs were taken from different blood and organ samples of experimentally ASFV and CSFV infected animals directly upon thawing of the material and after 7 days at 37°C in an incubator. Downstream handling was done as described above.

Finally, Genotube samples were generated from 96 negative wild boar blood samples of varying quality (almost optimal to dark haemolytic with impurities) to assess field applicability. In this case, nucleic acids were extracted using the QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit (Qiagen) on the respective instrument.

3. Results

In the first pilot trial, comparison of RT-PCR results showed no qualitative differences among EDTA and swab samples irrespective of the initial genome load. However, while quantitative ASF results were again comparable in terms of cq-values, marked shifts were observed between CSF blood and swab samples (see supplementary table 1). The latter showed up to 8 cq values difference.

Comparing the different swabs of the second pilot experiment treated with the manual extraction method, PCR results were roughly similar with differences mainly within one log step for all swabs. In general, slightly higher genome loads were found in flocked and forensic swabs (see figure 1 and supplementary table 2). In case of ASF, comparison with parallel extractions from EDTA blood using the same methodology, did not reveal any qualitative differences. Nevertheless, quantitative divergence was obvious but stayed within one log step or slightly above (see figure 1 and supplementary table 2). For CSF, qualitative results from EDTA blood were also confirmed using swab samples. Quantitative differences

were observed in the same manner (see supplementary table 3). Comparison of different extraction methods using the same swabs showed no qualitative changes. Slightly higher genome loads were detected upon nucleic acid extraction using the EZ1 automated system for both ASF and CSF (see figure 2 and supplementary table 4 for ASF, and supplementary table 3 for CSF). One Genotube sample showed negative results upon EZ1 extraction in both target and internal control PCR.

Testing of the additional Genotube samples showed matching qualitative results (see figures 3 and 4), and quantification cycle values differed in the range seen in the pilot trials. Testing of the CSF dilution series showed the expected dose response in both EDTA blood and Genotube samples (see figure 4). Using blood and organ samples from experimentally infected animals, Genotubes were shown to be suitable for organ swabbing, even if the samples were stored for 7 days at 37°C (see supplementary table 4). No qualitative differences occurred. However, blood samples showed the lowest variance. Comparative studies with FTA cards showed similar results on ASF samples stored for one week at 37°C (see supplementary table 4). All field samples gave negative results in the ASFV and CSFV specific PCRs while detection of internal controls was possible.

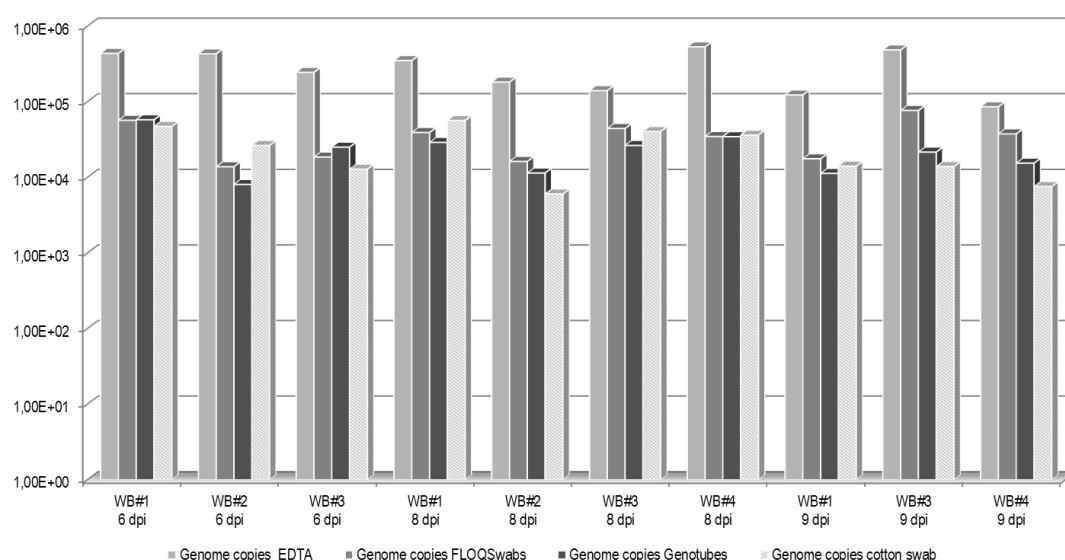


Fig. 1.: Comparison of blood and different blood swab samples after manual nucleic acid extraction using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and ASFV specific qPCR. Results are presented as genome copy numbers per µl based on a synthetic standard. Samples were taken from experimentally infected wild boar between days 6 and 9 post infection (dpi) with ASFV “Armenia08”.

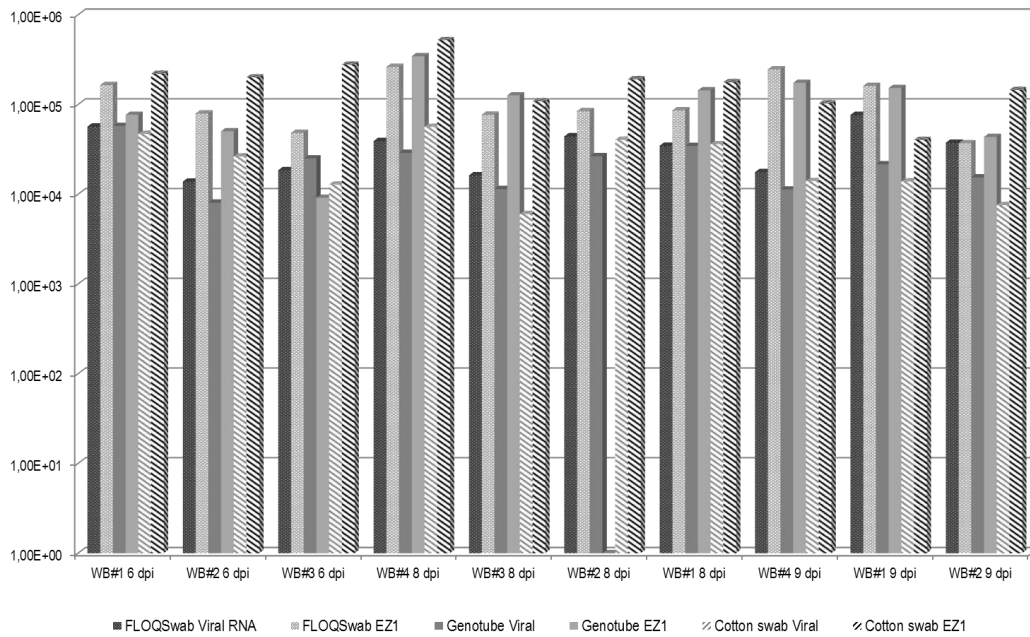


Fig. 2.: Comparison of different blood swab samples after manual and automated nucleic acid extraction and ASFV specific qPCR. The manual extraction was carried out using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), while automated extraction was performed employing the EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen). Results are presented as genome copy numbers per µl based on a synthetic standard. Samples were taken from experimentally infected wild boar between days 6 and 9 post infection (dpi) with ASFV “Armenia08”.

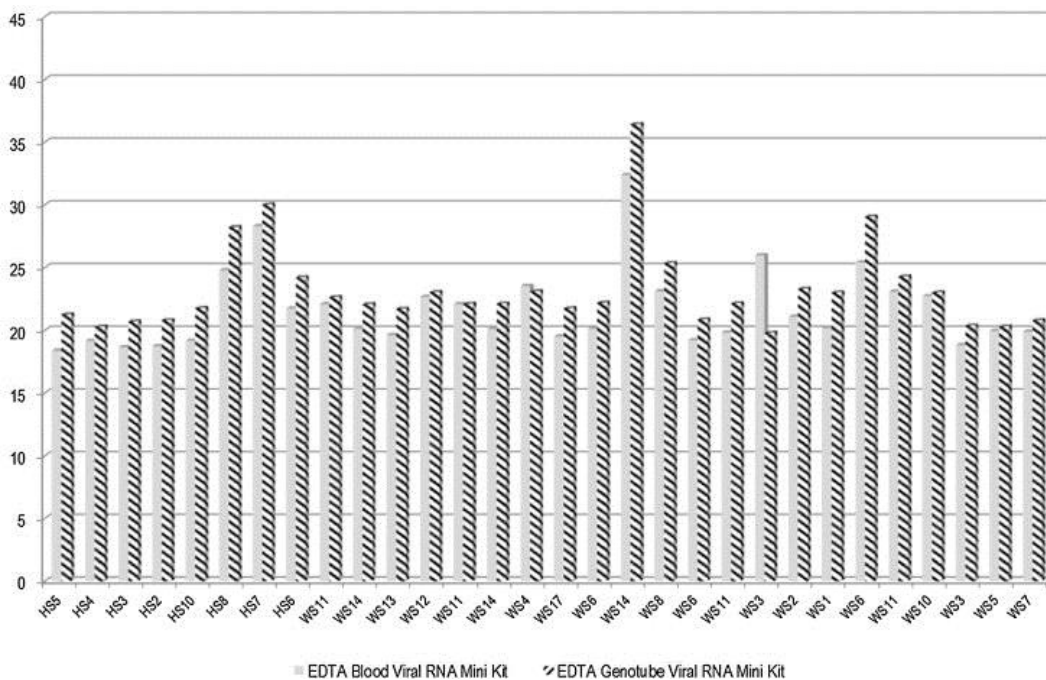


Fig. 3.: Testing of ASFV forensic swab (Genotube) samples in comparison with the parental EDTA blood sample after nucleic acid extraction using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Results are depicted as quantification cycle values.

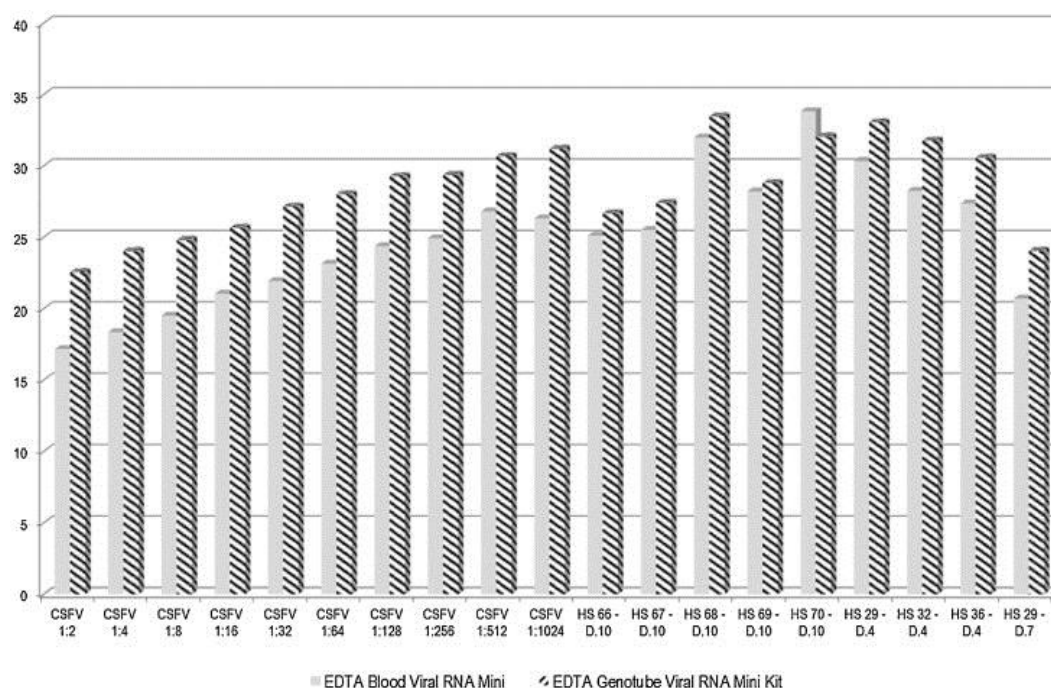


Fig. 4.: Testing of CSFV forensic swab (Genotube) samples in comparison with the parental EDTA blood sample after nucleic acid extraction using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Results are depicted as quantification cycle values.

4. Discussion

The recent introduction of ASF into the wild boar population of the EU has stressed the necessity of targeted surveillance and early warning actions (De la Torre et al., 2013). Based on the assumption that an increase in wild boar mortality could be observed upon introduction of either ASF or CSF, fallen wild boar are the primary target for passive surveillance. In most countries, hunters will observe and sample fallen wild boar and thus, early warning relies on their compliance. Lowering the effort involved in sampling and transport could increase willingness to cooperate.

Among the options are different swab samples that could be send via ordinary mail or courier to the competent laboratory. In general, rectal (faecal) or oropharyngeal swabs are easiest to obtain. Yet, these samples were shown to contain much lower genome loads than organs or blood, especially in the case of ASF (Blome et al., 2013). In contrast, dry blood samples, e.g. on filter papers or FTA cards (Braae et al., 2013, Michaud et al., 2007), have been shown to contain high viral loads and work for both RNA and DNA viruses. While filter papers would still need an additional device to drop blood onto the device or to somehow soak it, swab

sampling would minimize the necessary contact to the carcass (that can remain in the ecosystem while the region is free from swine fever) and allow shipment in the swab tube.

In the presented study, different swabs were tested for their suitability along with three different nucleic acid extraction methods to assess robustness of the approach. The most promising swab was tested in more detail.

It was shown that both ASFV and CSFV could be detected in nucleic acids derived from swab samples irrespective of the nucleic extraction method. In general, both testing of swabs by just immersing them in lysis buffer or by cutting small fragments was possible. To allow a retesting of samples in case of doubtful results or technical problems, fragment generation and testing is recommended. In this regard, the forensic Genotube swab had the advantage that cutting a suitable fragment was easiest and least contamination prone. Moreover, this device has been shown to be suitable for long term storage of ASF samples (K. Goller, unpublished data), and retesting of CSF samples after 35 days and two months confirmed stability also for the viral RNA (data not shown). In terms of genome load, the flocked swab was slightly superior (figure 1 and supplementary table 2), but fragment generation was most difficult.

As expected, shifts in genome load were seen when comparing results from EDTA blood and the corresponding swabs. These differences were in the range of roughly one log step (about 3 cq-values) for ASFV and slightly higher for CSFV. When judging on these differences and their impact on the fitness for purpose, it has to be kept in mind that the relevant fallen animals died from the disease in question and will therefore contain very high copy numbers of the respective pathogen. For this reason, the loss of sensitivity is probably acceptable, even if field samples would mean swabs of reddish fluid from any accessible part of the body rather than blood like in the presented study. In this regard, testing of field samples showed that even suboptimal samples did not negatively influence the diagnostic specificity (100 % based on 96 field blood samples from shot wild boar). Flexibility of the approach was further proven through inclusion of different organ samples. Although blood samples were again shown to be most robust, all organ samples from acutely infected animals were found positive in qPCR, even after seven days at 37°C. Here, results were comparable with FTA cards. A general drawback of swab (or FTA card) sampling alone is the loss of syndromic surveillance that could be carried out on the whole carcass. However, this drawback might be tolerable if the number of samples for targeted swine fever surveillance can be considerably increased. Suitability for other diseases should be tested as it can be assumed that other pathogens would be also detectable.

5. Conclusions

Blood swabs are suitable for a reliable ASF and CSF virus detection. Different swabs and extraction protocols could be robustly used. Forensic swabs showed advantages in terms of fragment preparation and further storage. Swabbing of organs is possible where no blood is available.

Taken together, swab samples could be recommended as a pragmatic approach to sample especially fallen wild boar for passive swine fever diagnosis.

Acknowledgements

We would like to thank all technicians involved in this study, especially Ulrike Kleinert, for their excellent work. This work has received funding through the European Union project RAPIDIA-Field (no. 289364).

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Artois, M., Depner, K.R., Guberti, V., Hars, J., Rossi, S., Rutili, D., 2002. Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Rev Sci Tech* 21, 287-303.
- Blome, S., Gabriel, C., Beer, M., 2013. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res* 173, 122-130.
- Braae, U.C., Johansen, M.V., Ngowi, H.A., Rasmussen, T.B., Nielsen, J., Uttenthal, A., 2013. Detection of African Swine Fever Virus DNA in Blood Samples Stored on FTA Cards from Asymptomatic Pigs in Mbeya Region, Tanzania. *Transbound Emerg Dis*.
- Costard, S., Mur, L., Lubroth, J., Sanchez-Vizcaino, J.M., Pfeiffer, D.U., 2013. Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res* 173, 191-197.
- De la Torre, A., Bosch, J., Iglesias, I., Munoz, M.J., Mur, L., Martinez-Lopez, B., Martinez, M., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2013. Assessing the Risk of African Swine Fever Introduction into the European Union by Wild Boar. *Transbound Emerg Dis*.
- Edwards, S., Fukusho, A., Lefevre, P.C., Lipowski, A., Pejsak, Z., Roehe, P., Westergaard, J., 2000. Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol* 73, 103-119.
- Fritzemeier, J., Teuffert, J., Greiser-Wilke, I., Staubach, C., Schluter, H., Moennig, V., 2000. Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol* 77, 29-41.
- Gogin, A., Gerasimov, V., Malogolovkin, A., Kolbasov, D., 2013. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res* 173, 198-203.
- Hoffmann, B., Beer, M., Schelp, C., Schirrmeier, H., Depner, K., 2005. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 130, 36-44.
- King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos,

- A.D., Drew, T.W., 2003. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* 107, 53-61.
- Michaud, V., Gil, P., Kwiatek, O., Prome, S., Dixon, L., Romero, L., Le Potier, M.F., Arias, M., Couacy-Hymann, E., Roger, F., Libeau, G., Albina, E., 2007. Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *J Virol Methods* 146, 257-265.
- Sanchez-Vizcaino, J.M., Mur, L., Martinez-Lopez, B., 2013. African swine fever (ASF): five years around Europe. *Vet Microbiol* 165, 45-50.

4.2.2 Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar – Extension towards African swine fever virus antibody detection

Sandra Blome^{*}, Katja V. Goller, Anja Petrov, Carolin Dräger, Jana Pietschmann, and
Martin Beer

*Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, 17493 Greifswald -
Insel Riems, Germany*

Corresponding author:

Dr. Sandra Blome
Friedrich-Loeffler-Institut
Institute of Diagnostic Virology
Suedufer 10
17493 Greifswald - Insel Riems
Phone: +49-38351-71144; Fax: +49-38351-71275
Email: sandra.blome@fli.bund.de

*Veterinary Microbiology, 2014
174 (3–4), 607–608*

To the Editor:

We recently reported on the use of blood swab samples for passive classical and African swine fever (CSF and ASF) surveillance in wild boar (Petrov et al., in press). Upon availability of the article online, we were asked by national and international colleagues whether this approach would be suitable also for antibody detection.

While antibody detection might not be the primary focus of diagnostic investigations in fallen animals, we think that an approach that would allow both pathogen and antibody detection in one easy-to-collect sample matrix, combined with simple shipment, and long-term storage, would be optimal under field conditions.

For this reason, we tried to rapidly answer this question on a limited set of sero-positive and sero-negative blood samples from animal experiments. Given the current epidemiological situation of ASF in the European Union wild boar population (cases in several Eastern Member States with a tendency to spread, see OIE WAHID), we feel that the audience of Veterinary Microbiology would benefit from a brief addendum to the above mentioned article. For this reason, we report on the outcome of our initial studies here, while further validation is still in progress.

Study design and outcome

A total of 42 porcine EDTA blood samples was employed to test applicability of swab fragments for antibody detection. The expected status of the blood sample was related to the corresponding serum sample of the same animal and sampling day. The result of the p72 antibody ELISA (Ingezim PPA Compac, Ingenasa, Madrid, Spain) was used as a reference. Genotube swabs (Prionics, Zurich, Switzerland), were dipped into the respective blood sample and left to dry for at least 12 h at room temperature. Thereafter, diamond-shaped fragments (app. 5 mm lateral length) were cut with sterile scissors and transferred to the ELISA system. To test samples close to the “worst-case-scenario”, 30 samples were included that had been stored for more than 21 months at 4°C. This set comprised 12 samples from sero-negative animals, and 18 samples from sero-positive animals. The latter had been immunized twice with an inactivated preparation of genotype II ASFV Armenia08 (Blome et al., 2014). Samples were included from days 28 to 41 post immunization. The second set of samples comprised animals that had been inoculated with ASFV OURT88/3 (genotype I, non-hemadsorbing). These samples (n = 10) had been taken 29 days post inoculation and were stored approximately one month at 4°C. Also here, negative animals (n=2) were included. To

compare the performance with dried blood on filter papers as foreseen in the ELISA protocol (see below), we tested 14 samples also on this matrix (the second set of samples and two long-term storage samples, see table 1).

The commercially available ID Screen[®] African Swine Fever Indirect antibody ELISA (ID.vet, Grabels, France) allows a protocol for dried blood on filter papers. We used this protocol to test the swab fragments. The original protocol foresees the use of two filter paper punches with a diameter of 6 mm. We replaced them with two of the above mentioned Genotube fragments and performed all subsequent steps according to the manufacturer's instructions.

Based on the above mentioned set of samples, we could clearly demonstrate that antibody detection is possible also from Genotube swabs (see table 1). Fourty out of 42 samples were in complete agreement with the serological status, and an additional sample that had a doubtful status was detected positive. Only one doubtful sample gave a negative result. Comparison of dried blood on filter paper and on Genotube swabs gave similar results (see table 1), also in terms of raw data values (data not shown). No false positive reactions occurred, even with samples stored for several months (see table 1).

Despite the fact, that further validation is clearly needed and ongoing, these initial results are most promising and could prompt the inclusion of antibody detection from swabs in the field. Due to the very high virulence of the ASFV strains currently circulating in Eastern Europe (Gabriel et al., 2012; Blome et al., 2013), antibody detection is still a rather rare finding. However, to obtain a full picture of the epidemiological situation, and to fulfill all legal requirements (e.g. Commission Decision 2003/422/EC), the search for antibodies is mandatory. Another important issue would be to isolate the causative virus strains for further characterization. In this respect, preliminary studies showed that ASFV isolation from Genotube swabs was possible in blood monocyte derived macrophage cultures while CSFV could not be isolated (data not shown). Probably, the latter could be obtained from RNA transfection.

Easy sampling and testing by using swabs for both pathogen and antibodies could facilitate this task and present a pragmatic approach also for other scenarios, e.g. for wild-life monitoring in Africa.

References:

- Blome, S., Gabriel, C., Beer, M., 2014. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*. Jun 30;32(31):3879-82.
- Blome, S., Gabriel, C., Dietze, K., Breithaupt, A., Beer, M., 2012. High virulence of African swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerg Infect Dis* 18, 708.
- Gabriel, C., Blome, S., Malogolovkin, A., Parilov, S., Kolbasov, D., Teifke, J.P., Beer, M., 2011. Characterization of African Swine Fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg Infect Dis* 17, 2342-2345.
- Petrov, A., Schotte, U., Pietschmann, J., Dräger, C., Beer, M., Goller, K. V., Blome, S. Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar. 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.07.030

5 DISKUSSION

Durch den Eintrag der Afrikanischen Schweinepest in die Europäische Union, ist eine bislang exotische Tierseuche in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. Das Fehlen eines effizienten Impfstoffes und die mögliche Beteiligung von Zecken in der Epidemiologie der Erkrankung, machen die Bekämpfung komplex und schwierig. Des Weiteren fehlten Basisdaten zum Verhalten des ASPV im Schwarzwild. Aus diesem Grund wurde von der EU ein internationales Forschungsprojekt gefördert, in das sich die vorgestellten Arbeiten einbetten. Das multi-nationale Projekt mit dem Akronym ASFORCE (*Targeted research effort on African swine fever*) untergliederte sich in fünf Themen. Ziele waren die Entwicklung von kosteneffizienten Surveillance- und Bekämpfungsstrategien für unterschiedliche Szenarien mit und ohne Beteiligung von Vektoren, Risikoanalysen unter Einbeziehung der möglichen Beteiligung des Europäischen Schwarzwilds und möglicher Zeckenvektoren, Impfstoffentwicklung basierend auf rational entwickelten Deletionsmutanten und Vektorvakzinen sowie Fortbildungsmaßnahmen für alle Entscheidungsträger.

5.1 Biologische Charakterisierung aktueller Isolate

5.1.1 Untersuchungen zum Einfluss der Infektionsdosis

Die ASPV-Stämme, die derzeit in den Trans-Kaukasischen Ländern, der Russischen Föderation und den baltischen Staaten kursieren, zeigen unter experimentellen Bedingungen eine sehr hohe Virulenz in Haus- und europäischen Wildschweinen (Blome et al., 2012, Gabriel et al., 2011, Mur et al., 2014). Bislang bestätigen sich diese Beobachtungen auch unter Feldbedingungen (Pejsak et al., 2014), was für die Bekämpfung der Erkrankung unter Umständen ein günstiger Faktor wäre, da die Etablierung einer Endemie in der Wildschweinpopulation unwahrscheinlicher erscheint. Dies wurde kürzlich in einem mathematischen Modell zur ASP-Situation in Südrussland bestätigt (Lange et al., 2014). Es ergeben sich auch aus diesen Modellierungen keine Hinweise auf die Etablierung einer Endemie, die durch kontinuierliche Perpetuierung der Infektion in einer Population gekennzeichnet wäre. Diese Analysen beruhen auf der Annahme, dass vorwiegend akut-letale Krankheitsverläufe auftreten. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise, dass es infektionsdosisabhängige Krankheitsverläufe geben kann (Kleiboeker, 2002). Da unter Feldbedingungen geringe Infektionsdosen, z.B. über die Aufnahme ASPV-haltiger Wurst-

oder Fleischprodukte oder über den Kontakt zu virushaltigen Sekreten oder Exkreten, wahrscheinlich sind, könnte dies relevant für Epidemiologie und Bekämpfung sein. Insbesondere die Entstehung von chronisch kranken oder persistierend infizierten Tieren würde die Bekämpfung deutlich erschweren. Aus diesem Grund wurde ein Versuch mit sehr geringen Inokulationsdosen des gut charakterisierten ASPV-Isolats aus Armenien (Genotyp II) in Haus- und europäischen Wildschweinen durchgeführt.

Der Versuch zeigte, dass es unter experimentellen Bedingungen keine Dosisabhängigkeit des Erkrankungsverlaufes mit dem verwendeten ASPV-Isolat gibt. Alle Versuchstiere zeigten dosisunabhängig einen akut-letalen Krankheitsverlauf; es wurden weder chronisch erkrankte noch persistierend infizierte Tiere induziert. Dabei hatten die geringen Infektionsdosen initial nur genügt, um drei kümmernde Wildschweine zu infizieren. In der Folge kam es zu einer langsamen, aber stetigen Ansteckung der Kontakttiere, vermutlich über Kannibalismus bzw. bluthaltige Se- und Exkrete. Die Tiere erkrankten somit zeitversetzt, was eine allmähliche Durchseuchung der Gruppen nach sich zog. Obgleich die individuellen Krankheitsverläufe sehr ähnlich waren, und innerhalb einer Woche nach dem ersten Auftreten von Symptomen zum Tod der Tiere führten, war der Gesamtverlauf deutlich länger (>35 Tage). Dies könnte die Erkennung des Krankheitsgeschehens im Feld erschweren. Die moderate Kontagiosität, die sich auch hier bestätigte, steht dabei im Gegensatz zur häufig zitierten Lehrmeinung, die sich z.B. in den Handbüchern der FAO findet (<http://www.fao.org/docrep/004/X8060E/X8060E00.HTM>). Um die Achtsamkeit der Veterinäre und Landwirte zu erhöhen, sollte diese Information jedoch dringend weitergegeben werden.

Es bleibt zu erwähnen, dass zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion Antikörper mit den verfügbaren Standardverfahren (ELISA, indirekte Immunperoxidasetest) detektiert werden konnten. Dies sollte bei der Wahl der diagnostischen Methoden im Rahmen der Überwachungs- und Bekämpfungskonzepte in Betracht gezogen werden.

Die gewonnen Erkenntnisse stehen nun für epidemiologische Modelle und Risikobewertungen zur Verfügung und können helfen, die Bekämpfungsstrategien zu verbessern.

5.1.2 Vergleichende Untersuchung zur Klinik und Pathologie aktueller ASPV-Isolate

Neben den bereits genannten, hoch-virulenten ASPV-Stämmen des Genotyps II (Kaukasus, Russland und Baltikum), kursieren in Europa derzeit Virusstämme des Genotyps I auf Sardinien. Aktuelle afrikanische ASP-Viren gehören z.B. zum Genotyp IX und X (Kenia) (Costard et al., 2009, Bishop et al., 2015).

Zur vergleichenden Charakterisierung der Klinik und Pathologie wurden Virusstämme aus Armenien, Litauen, Sardinien und Kenia eingesetzt. Das kenianische Isolat aus dem Jahre 2005 war im Rahmen eines EU geförderten Projektes (ASFRISK) als moderat virulent eingestuft worden und sollte sich somit von den anderen Stämmen unterscheiden.

Unter experimentellen Bedingungen verursachten jedoch alle getesteten Isolate einen akut-letalen Krankheitsverlauf mit hohem Fieber, Anorexie, Apathie, Konjunktivitiden, Zyanosen und Hämorrhagien. Zu den pathologisch-anatomischen Befunden gehörten vor allem hämorrhagische Lymphknoten, insbesondere im Magen-Leber-Bereich, und Lungenödeme. Die in Lehrbüchern häufig erwähnte Splenomegalie trat hingegen nur selten auf.

Die schweren, aber unspezifischen Symptome zeigen, dass eine verlässliche Labordiagnostik zwingend erforderlich ist, um die ASP zeitnah zu detektieren und von anderen Allgemeinerkrankungen des Schweins zu unterscheiden. Auch diese Informationen sollten den betroffenen Berufsgruppen zur Verfügung gestellt werden. Der erstellte Übersichtsartikel soll dazu beitragen.

5.2 Entwicklung eines vereinfachten Beprobungsverfahrens für Fallwild

Vor dem Hintergrund des Eintrags der Afrikanischen Schweinepest (ASP) in die Schwarzwildpopulation der EU ist auch in Deutschland die Surveillance im Sinne einer Früherkennung zu intensivieren. Dabei liegt der Hauptfokus auf Fallwild, d.h. auf Tieren, die verendet aufgefunden werden. In Tieren, die an der ASP verendet sind, findet sich das Virus in großen Mengen, insbesondere blutgebunden, aber auch in allen anderen Geweben, Se- und Exkreten (Blome et al., 2013). Dabei ist die Detektion des Virus mittels PCR aus kleinsten Probenmengen über Monate ohne Sensitivitätsverlust möglich, unabhängig von den Lagerungstemperaturen, denen die Probenmatrix ausgesetzt ist (S. Blome, persönliche Mitteilung). Um die Probennahme zu rationalisieren und den Aufwand für die beteiligte Jägerschaft möglichst gering zu halten, wurde erprobt, ob sich die Untersuchung über Blutupferproben realisieren ließe. Da beim Auffinden verendeter Wildschweine auch an die Klassische Schweinepest (KSP) gedacht werden muss, die ebenfalls an den östlichen Grenzen der EU (Lettland) vorkommt, wurde diese Erkrankung in die Untersuchungen mit einbezogen. Ein Vorteil der verwendeten Tupfer ist die einfache Handhabung. Es genügt, einen Tupfer in Blut beziehungsweise bluthaltige Flüssigkeiten zu tränken. Anschließend kann der Tupfer in seine Hülle zurückgesteckt werden. Es entfällt somit im Idealfall das komplette Aufbrechen des Tierkörpers und die anschließende Entnahme von Gewebeproben. Da es sich bei den getesteten Tupfern um trockene Systeme handelt, ist für den anschließenden Versand (unter UN 3373) keine Kühlung notwendig, was das Verfahren weiter vereinfacht.

Es konnte gezeigt werden, dass sich verschiedenste Trockentupfer in Kombination mit Routineextraktionsmethoden für den Nachweis von ASPV und KSPV eignen. Demnach genügt prinzipiell ein einziger mit Blut getränkter Tupfer um eine erste ASP- und KSP-Diagnostik durchzuführen. Für ASP konnte zusätzlich gezeigt werden, dass auch eine Antikörperdetektion aus den Tupferproben möglich ist. Nach erfolgreicher Validierung der Tupfer als Probenmatrix wurden diese in die amtliche Methodensammlung des Friedrich-Loeffler-Instituts aufgenommen (Anonymous, 2014a). Somit steht diese vereinfachte Probennahme für die passive Überwachung zur Verfügung und kann unter Feldbedingungen weiter erprobt werden.

5.3 Schlussfolgerungen

Die beschriebenen Studien zur Charakterisierung aktueller ASPV-Stämme tragen zum Verständnis der Epidemiologie der ASP bei und können die Datengrundlage für die Anpassung und Optimierung von Bekämpfungsmaßnahmen bilden. Dabei sind insbesondere die moderate Kontagiosität der Erkrankung sowie der Dosis-unabhängige akut-letale Verlauf ohne nennenswerte Antikörperproduktion bedeutsam.

Um die momentan in Deutschland durchgeführte passive Überwachung zu vereinfachen wurden trockene Tupfer als Probenmatrix getestet und validiert. Dies vereinfacht die Probennahme erheblich und soll die Zahl des untersuchten Fallwilds zukünftig erhöhen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) ist eine anzeigepflichtige virale Erkrankung der echten Schweine (*Suidae*). Der Eintrag des gleichnamigen Virus in Schweinebestände ist mit enormen Auswirkungen auf die Schweineproduktion und den Schweinehandel verbunden. Vor dem Hintergrund der derzeitigen Seuchensituation kann ein Eintrag des ASPV nach Deutschland, insbesondere aus Osteuropa, nicht ausgeschlossen werden.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass es nach Infektion mit geringen Dosen zu veränderten Krankheitsverläufen und persistierend infizierten Tieren kommen kann. Zu einer Aufnahme solch geringer Virusmengen kann es durch das Verzehren von virushaltigen Speiseabfällen oder Kadavern kommen. Vor diesem Hintergrund wurde ein Versuch mit sehr geringen Infektionsdosen in Haus- und Wildschweinen durchgeführt. Der Versuch zeigte, dass die Infektion mit einem aktuellen Isolat aus Armenien, unabhängig von der Infektionsdosis, immer akut-letal verläuft und es somit keine Hinweise auf persistierend infizierte Tiere gibt. Sowohl klinische Symptome als auch pathologische Befunde waren oftmals unspezifisch und vergleichbar mit anderen aktuellen Isolaten aus Litauen, Sardinien und Kenia. Jedoch wurden durch die geringe Infektionsdosis initial nur drei kümmernde Wildschweine infiziert. Davon unabhängig sind in der Pathologie insbesondere vergrößerte und hämorrhagische Lymphknoten im Magen-Leber-Bereich aufgefallen. Die in der Literatur beschriebene Splenomegalie konnte hingegen nur selten beobachtet werden. Die erhobenen Daten können nun in epidemiologische Modelle sowie optimierte Bekämpfungsstrategien einfließen.

Für die Bekämpfung ist es von großer Bedeutung einen Eintrag zeitnah zu detektieren. Aus diesem Grund sind Jäger angehalten tot aufgefundene Wildschweine zu beproben. Um die Beprobung zu vereinfachen und die Bereitschaft der Jägerschaft zu erhöhen, wurden unterschiedliche Tupfersysteme untersucht und validiert. Die Ergebnisse zeigen, dass es genügt einen in Blut getränkten Tupfer einzusenden. Mittels dieses Tupfers kann eine initiale Diagnostik für ASP und KSP erfolgen. Für ASP konnte ferner gezeigt werden, dass eine Antikörperdetektion möglich ist. Somit steht den Jägern ein sehr einfaches und schnelles Beprobungsverfahren zur Verfügung, welches eine zuverlässige Diagnostik zulässt.

7 SUMMARY

African swine fever is a notifiable viral disease of the *Suidae*. An introduction of the eponymous virus into a free area is accompanied by severe consequences for pig production and trade. The current situation in Eastern Europe presents a constant threat for disease spread into Germany. Indication exist that low dose infections could lead to modified disease courses and persistently infected animals. Low infection doses are likely due to ingestion of swill or contact to carcasses. To investigate these issues, an animal trial was conducted using oral low dose infection with a recent ASFV strain from Armenia in domestic pigs and European wild boar. Irrespective of the virus dose, all animals showed acute-lethal disease courses under the experimental conditions. No evidence was found for persistently infected animals.

Both clinical signs and pathological findings were often unspecific. However, initial only runting wild boar were infected. Isolates from Lithuania, Sardinia, and Kenya led to comparable clinical courses. A constant finding that could be indicative for ASF was enlarged and hemorrhagic lymphnodes in the gastro-hepatic area. The splenomegaly that is usually described in literature was only rarely seen.

Early detection of an introduction is crucial for the control of ASF. To this means, fallen wild boar have to be sampled and tested. To facilitate sampling, and to increase the compliance of hunters, different swabs were tried out and validated. The results show that swabs submerged in blood are sufficient for ASF and CSF diagnosis. These swabs are also suitable for antibody detection in the case of ASF. Consequently, a rapid and swift sampling system is now available that guarantees reliable diagnosis.

8 REFERENZEN

- Anderson, E. C., G. H. Hutchings, N. Mukarati and P. J. Wilkinson, 1998: African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Vet Microbiol*, 62, 1-15.
- Anderson, E. C., S. M. Williams, S. P. Fisher-Hoch and P. J. Wilkinson, 1987: Arachidonic acid metabolites in the pathophysiology of thrombocytopenia and haemorrhage in acute African swine fever. *Res Vet Sci*, 42, 387-394.
- Andrés, G.-E. R., Viñuela E, Salas ML, Rodríguez JM, 2001: African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity. *J Virol*, 6758-6768.
- anonymous, 1988: Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest (Schweinepest-Verordnung). pp. 1-23. juris, Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz.
- Anonymous, 1999: Verordnung über hygienische Anforderungen beim Halten von Schweinen. Art. 5 V v edn., p. 12.
- Anonymous, 2000: *Recognizing African swine fever - A field manual*. FAO.
- Anonymous, 2003: Commission Decision of 26 May 2003 approving an African swine fever diagnostic manual (2003/422/EC). In: O. J. E. Union (ed), pp. 35-49.
- Anonymous, 2006: EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR AFRICAN SWINE FEVER (EURL-ASF). Available at: <http://asf-referencelab.info/asf/en/>.
- Anonymous, 2012: International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. Virus taxonomy: 2012 release. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version2012>.
- Anonymous, 2013: Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG). pp. 1-33. Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz.
- Anonymous, 2014a: Amtliche Methodensammlung - Afrikanische Schweinepest. Available at: http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam/uploads/Publikationen/Amtliche_Methodensammlung/TS02-Afrikanische_Schweinepest-20140731.pdf (accessed 28.07.2014 2014).
- Anonymous, 2014b: DURCHFÜHRUNGSBESCHLUSS DER KOMMISSION vom 9. Oktober 2014 mit tierseuchenrechtlichen Maßnahmen zur Bekämpfung der Afrikanischen Schweinepest in bestimmten Mitgliedstaaten und zur Aufhebung des Durchführungsbeschlusses 2014/178/EU. In: EU (ed), 2014/709/EU, p. 16.
- Arias, M. and J. M. Sánchez-Vizcaíno, 2008: African swine fever eradication: the Spanish model. *Trends in Emerging Viral Infections in Swine*, 133-139.
- Arias, M. a. S.-V., J.M. , 2002: African Swine Fever. In: K. J. a. Z. Y. Morilla A., J. J. (ed), *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, pp. pp. 119-124. Iowa State Press, Iowa, USA.
- Artois, M., K. R. Depner, V. Guberti, J. Hars, S. Rossi and D. Rutili, 2002: Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Rev Sci Tech*, 21, 287-303.
- Bastos, A. D., M. L. Penrith, C. Cruciere, J. L. Edrich, G. Hutchings, F. Roger, E. Couacy-Hymann and R. T. G, 2003: Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol*, 148, 693-706.
- Bastos, A. D., M. L. Penrith, F. Macome, F. Pinto and G. R. Thomson, 2004: Co-circulation of two genetically distinct viruses in an outbreak of African swine fever in Mozambique: no evidence for individual co-infection. *Vet Microbiol*, 103, 169-182.

- Bioinformatics, S. S. I. o., 2008: ViralZone. Available at: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/12.html.
- Bishop, R. P., C. Fleischauer, E. P. de Villiers, E. A. Okoth, M. Arias, C. Gallardo and C. Upton, 2015: Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X. *Virus Genes*.
- Blome, S., C. Gabriel and M. Beer, 2013: Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res*, 173, 122-130.
- Blome, S., C. Gabriel, K. Dietze, A. Breithaupt and M. Beer, 2012: High virulence of African swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerg Infect Dis*, 18, 708.
- Boinas, F., R. Ribeiro, S. Madeira, M. Palma, I. de Carvalho, S. Nuncio and A. Wilson, 2014: The medical and veterinary role of *Ornithodoros erraticus* complex ticks (Acari: Ixodida) on the Iberian Peninsula. *Journal of vector ecology*, 39, 238-248.
- Boinas, F. S., G. H. Hutchings, L. K. Dixon and P. J. Wilkinson, 2004: Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol*, 85, 2177-2187.
- Boinas, F. S., A. J. Wilson, G. H. Hutchings, C. Martins and L. J. Dixon, 2011: The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. *PLoS One*, 6, e20383.
- Boshoff, C. I., A. D. S. Bastos, L. J. Gerber and W. Vosloo, 2007: Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973-1999). *Vet Microbiol*, 121, 45-55.
- Braae, U. C., M. V. Johansen, H. A. Ngowi, T. B. Rasmussen, J. Nielsen and A. Uttenthal, 2013: Detection of African Swine Fever Virus DNA in Blood Samples Stored on FTA Cards from Asymptomatic Pigs in Mbeya Region, Tanzania. *Transbound Emerg Dis*.
- Breese and D. C.J., 1966: Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*, 28, 420-428.
- Brookes, S. M., L. K. Dixon and R. M. Parkhouse, 1996: Assembly of African Swine fever virus: quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo. *Virology*, 224, 84-92.
- Canals, A., A. Oleaga, R. Pérez, J. Dominguez, A. Encinas and J. M. Sánchez-Vizcaino, 1990: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs infested with the tick *Ornithodoros erraticus*. *Vet Parasitol*, 37.
- Carrasco, L., M. d. L. F. Chacon, J. Martin de Las Mulas, J. C. Gomez-Villamandos, M. A. Sierra, C. J. Villeda and P. J. Wilkinson, 1997: Ultrastructural changes related to the lymph node haemorrhages in acute African swine fever. *Res Vet Sci*, 62, 199-204.
- Carrasco, L., F. C. de Lara, J. C. Gomez-Villamandos, M. J. Bautista, C. J. Villeda, P. J. Wilkinson and M. A. Sierra, 1996: The pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages in acute African swine fever. *Res Vet Sci*, 61, 193-198.
- Carrascosa, J., J. Carazo, A. L. Carrascosa, N. García, A. Santisteban and E. Viñuela, 1984: General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology*, 132, 160-172.
- Chapman, D. A., A. C. Darby, M. Da Silva, C. Upton, A. D. Radford and L. K. Dixon, 2011: Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg Infect Dis*, 17, 599-605.
- Chapman, D. A., V. Tcherepanov, C. Upton and L. K. Dixon, 2008: Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol*, 89, 397-408.
- Chastel, C., A. Main, C. Guiguen, G. le Lay, M. Quillien, J. Monnat and J. Beaucournu, 1985: The isolation of Meaban virus, a new Flavivirus from the seabird tick *Ornithodoros (Alectorobius) maritimus* in France. *Arch Virol*, 83, 129-140.

- Coggins, L., 1966: Growth and certain stability characteristics of African swine fever virus. *Am J Vet Res*, 27, 1351-1358.
- Costard, S., L. Mur, J. Lubroth, J. M. Sanchez-Vizcaino and D. U. Pfeiffer, 2013: Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res*, 173, 191-197.
- Costard, S., B. Wieland, W. de Glanville, F. Jori, R. Rowlands, W. Vosloo, F. Roger, D. U. Pfeiffer and L. K. Dixon, 2009: African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 2683-2696.
- Cubillos, C., S. Gomez-Sebastian, N. Moreno, M. C. Nunez, L. K. Mulumba-Mfumu, C. J. Quembo, L. Heath, E. M. Etter, F. Jori, J. M. Escribano and E. Blanco, 2013: African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. *Virus Res*, 173, 159-167.
- de Carvalho Ferreira, H., S. Tudela Zúquete, M. Wijnveld, E. Weesendorp, F. Jongejan, A. Stegeman and W. Loeffen, 2014: No evidence of African swine fever virus replication in hard ticks. *ticks tick borne Dis.*, 5, 582-589.
- de Carvalho Ferreira, H. C., E. Weesendorp, A. R. W. Elbers, A. Bouma, S. Quak, J. A. Stegeman and W. L. A. Loeffen, 2012: African swine fever virus excretion patterns in persistently infected animals: A quantitative approach. *Vet Microbiol*, 160, 327-340.
- De la Torre, A., J. Bosch, I. Iglesias, M. J. Munoz, L. Mur, B. Martinez-Lopez, M. Martinez and J. M. Sanchez-Vizcaino, 2013: Assessing the Risk of African Swine Fever Introduction into the European Union by Wild Boar. *Transbound Emerg Dis*.
- de Villiers, C. G., Marisa Arias, Melissa da Silva, Chris Upton, Raquel Martin, Richard P. Bishop, 2010: Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*, 400, 128 - 136.
- Detray, D. E., 1957: African swine fever in wart hogs (*Phacochoerus aethiopicus*). *J Am Vet Med Assoc*, 130, 537-540.
- Dixon, L. K., C. C. Abrams, D. D. Chapman, L. C. Goatley, C. L. Netherton, G. Taylor and H. H. Takamatsu, 2013: Prospects for development of African swine fever virus vaccines. *Dev Biol (Basel)*, 135, 147-157.
- Edwards, J. F., W. J. Dodds and D. O. Slauson, 1984: Coagulation changes in African swine fever virus infection. *Am J Vet Res*, 45, 2414-2420.
- Edwards, S., A. Fukusho, P. C. Lefevre, A. Lipowski, Z. Pejsek, P. Roehle and J. Westergaard, 2000: Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol*, 73, 103-119.
- Ekue, N. F., P. J. Wilkinson and R. C. Wardley, 1989: Infection of pigs with the Cameroon isolate (Cam/82) of African swine fever virus. *J Comp Pathol*, 100, 145-154.
- Esteves, A., M. I. Marques and J. V. Costa, 1986: Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology*, 152, 192-206.
- Fernandez, A., J. Perez, L. Carrasco, M. A. Sierra, M. Sanchez-Vizcaino and A. Jover, 1992: Detection of African swine fever viral antigens in paraffin-embedded tissues by use of immunohistologic methods and polyclonal antibodies. *Am J Vet Res*, 53, 1462-1467.
- Fritzemeier, J., J. Teuffert, I. Greiser-Wilke, C. Staubach, H. Schluter and V. Moennig, 2000: Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol*, 77, 29-41.
- Gabriel, C., S. Blome, A. Malogolovkin, S. Parilov, D. Kolbasov, J. P. Teifke and M. Beer, 2011: Characterization of african Swine Fever virus caucasus isolate in European wild boars. *Emerg Infect Dis*, 17, 2342-2345.
- Gallardo, C., J. Fernandez-Pinero, V. Pelayo, I. Gazev, I. Markowska-Daniel, G. Pridotkas, R. Nieto, P. Fernandez-Pacheco, S. Bokhan, O. Nevolko, Z. Drozhzhe, C. Perez, A. Soler, D. Kolvasov and M. Arias, 2014: Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe. *Emerg Infect Dis*, 20, 1544-1547.

- Gallardo, C., E. Okoth, V. Pelayo, R. Anchuelo, E. Martin, A. Simon, A. Llorente, R. Nieto, A. Soler, R. Martin, M. Arias and R. P. Bishop, 2011: African swine fever viruses with two different genotypes, both of which occur in domestic pigs, are associated with ticks and adult warthogs, respectively, at a single geographical site. *J Gen Virol*, 92, 432-444.
- Gallardo, C., A. Reis, G. Kalema-Zikusoka, J. Malta, A. Soler, E. Blanco, R. Parkhouse and A. Leitão, 2009: Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever. *Clin Vaccine Immunol*, 16, 1012-1020.
- García-Escudero R, A. G., Almazán F, Viñuela E., 1998: Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72. *J Virol*.
- Genovesi, E. V., R. C. Knudsen, T. C. Whyard and C. A. Mebus, 1988: Moderately virulent African swine fever virus infection: blood cell changes and infective virus distribution among blood components. *Am J Vet Res*, 49, 338-344.
- Gers, S., W. Vosloo, T. Drew, A. B. Lubisi, A. Pardini and M. Williams, 2010: Experimental Infection of Common Warthogs (*Phacochoerus africanus*) and Bushpigs (*Potamochoerus larvatus*) with Classical Swine Fever Virus II: A Comparative Histopathological Study. *Transbound Emerg Dis*.
- Giammarioli, M., C. Gallardo, A. Oggiano, C. Iscaro, R. Nieto, C. Pellegrini, S. Dei Giudici, M. Arias and G. M. De Mia, 2011: Genetic characterisation of African swine fever viruses from recent and historical outbreaks in Sardinia (1978-2009). *Virus Genes*, 42, 377-387.
- Giammarioli, M., C. Pellegrini, C. Casciari and G. M. De Mia, 2008: Development of a novel hot-start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus. *Vet Res Commun*, 32, 255-262.
- Goatley, L. C. and L. K. Dixon, 2011: Processing and localization of the african swine fever virus CD2v transmembrane protein. *J Virol*, 85, 3294-3305.
- Gogin, A., V. Gerasimov, A. Malogolovkin and D. Kolbasov, 2013: African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res*, 173, 198-203.
- Gomez-Villamandos, J. C., M. J. Bautista, P. J. Sanchez-Cordon and L. Carrasco, 2013: Pathology of African swine fever: the role of monocyte-macrophage. *Virus Res*, 173, 140-149.
- Gomez-Villamandos, J. C., L. Carrasco, M. J. Bautista, M. A. Sierra, M. Quezada, J. Hervas, L. Chacon Mde, E. Ruiz-Villamor, F. J. Salguero, P. J. Sonchez-Cordon, S. Romanini, A. Nunez, T. Mekonen, A. Mendez and A. Jover, 2003: African swine fever and classical swine fever: a review of the pathogenesis. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 110, 165-169.
- Gomez-Villamandos, J. C., J. Hervas, A. Mendez, L. Carrasco, J. Martin de las Mulas, C. J. Villeda, P. J. Wilkinson and M. A. Sierra, 1995a: Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J Gen Virol*, 76 (Pt 9), 2399-2405.
- Gomez-Villamandos, J. C., J. Hervas, A. Mendez, L. Carrasco, C. J. Villeda, P. J. Wilkinson and M. A. Sierra, 1995b: Pathological changes in the renal interstitial capillaries of pigs inoculated with two different strains of African swine fever virus. *J Comp Pathol*, 112, 283-298.
- Gomez del Moral, M., Ortuno, E., Fernandez-Zapatero, P., Alonso, C., Ezquerra, A., Dominguez, J., 1999: African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J Virol*, 73 (3), 2173-2180.

- Gonzalez, A., V. Calvo, F. Almazan, J. M. Almendral, J. C. Ramirez, I. de la Vega, R. Blasco and E. Vinuela, 1990: Multigene families in African swine fever virus: family 360. *J Virol*, 64, 2073-2081.
- Gulenkin, V. M., F. I. Korennoy, A. K. Karaulov and S. A. Dudnikov, 2011: Cartographical analysis of African swine fever outbreaks in the territory of the Russian Federation and computer modeling of the basic reproduction ratio. *Prev Vet Med*, 102, 167-174.
- Haines, F. J., M. A. Hofmann, D. P. King, T. W. Drew and H. R. Crooke, 2013: Development and validation of a multiplex, real-time RT PCR assay for the simultaneous detection of classical and African swine fever viruses. *PLoS One*.
- Haresnape, J. M., S. A. Lungu and F. D. Mamu, 1985: A four-year survey of African swine fever in Malawi. *The Journal of hygiene*, 95, 309-323.
- Haresnape, J. M. and P. J. Wilkinson, 1989: A study of African swine fever virus infected ticks (*Ornithodoros moubata*) collected from three villages in the ASF enzootic area of Malawi following an outbreak of the disease in domestic pigs. *Epidemiol Infect*, 102, 507-522.
- Hess, W. R., R. G. Endris, T. M. Haslett, M. J. Monahan and J. P. McCoy, 1987: Potential arthropod vectors of African swine fever virus in North America and the Caribbean basin. *vet Parasitol.*, 26, 314-317.
- Hoffmann, B., M. Beer, C. Schelp, H. Schirrmeier and K. Depner, 2005: Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods*, 130, 36-44.
- Hoogstraal, H., C. Clifford and J. Keirans, 1979: The *Ornithodoros* (*Alectorobius*) *capensis* group (Acarina: Ixodoidea: Argasidae) of the palearctic and oriental regions. O. (A.) *coniceps* identity, bird and mammal hosts, virus infections, and distribution in Europe, Africa, and Asia. *The Journal of parasitology*, 65, 395-407.
- Howey, E. B., V. O'Donnell, H. C. d. C. Ferreira, M. V. Borca and J. Arzt, 2013: Pathogenesis of highly virulent African swine fever virus in domestic pigs exposed via intraoropharyngeal, intranasopharyngeal, and intramuscular inoculation, and by direct contact with infected pigs. *Virus Res*, 12.
- Jori, F. and A. D. S. Bastos, 2009: Role of Wild Suids in the Epidemiology of African Swine Fever. *EcoHealth*, 6, 296-310.
- Karalova, E., G. Arzumanyan, O. Zakarian, G. Voskanian, K. Sarkisian and Z. Karalian, 2012: [Dynamics of changes in the composition of leukocyte population of peripheral blood during the African swine fever]. *Vopr Virusol.*, 57, 27-31.
- Khomenko, S., D. Beltrán-Alcrudo, A. Rozstalnyy, A. Gogin, D. Kolbasov, J. Pinto, J. Lubroth and V. Martin, 2013: African swine fever in the Russian Federation: risk factors for Europe and beyond. *EMPRES Watch*, pp. 1-14.
- King, D. P., S. M. Reid, G. H. Hutchings, S. S. Grierson, P. J. Wilkinson, L. K. Dixon, A. D. Bastos and T. W. Drew, 2003: Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods*, 107, 53-61.
- King, K., D. Chapman, J. M. Argilaguët, E. Fishbourne, E. Hutet, R. Cariolet, G. Hutchings, C. A. Oura, C. L. Netherton, K. Moffat, G. Taylor, M. F. Le Potier, L. K. Dixon and H. H. Takamatsu, 2011: Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine*, 29, 4593-4600.
- Kleiboeker, S. B., 2002: Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 18, 431-451.

- Krug, Larson, E. AC and R. LL., 2012: Disinfection of foot-and-mouth disease and African swine fever viruses with citric acid and sodium hypochlorite on birch wood carriers. 156, 96-101.
- Krug, P. W., L. J. Lee, A. C. Eslami, C. R. Larson and L. Rodriguez, 2011: Chemical disinfection of high-consequence transboundary animal disease viruses on nonporous surfaces. *Biologicals*.
- Lange, M., H. Siemen, S. Blome and H. H. Thulke, 2014: Analysis of spatio-temporal patterns of African swine fever cases in Russian wild boar does not reveal an endemic situation. *Prev Vet Med*.
- Lubisi, Armanda Duarte Slager Bastos, Rahana M. Dwarka and W. Vosloo, 2007: Intra-genotypic resolution of African swine fever viruses from an East African domestic pig cycle: a combined p72-CVR approach. *Virus Genes*, 35, 729-735.
- Luther, N. J., K. A. Majiyagbe, D. Shamaki, L. H. Lombin, J. F. Antiagbong, Y. Bitrus and O. Owolodun, 2007: Detection of African swine fever virus genomic DNA in a Nigerian red river hog (*Potamochoerus porcus*). *Vet Rec*, 160, 58-59.
- Lyra, T. M., 2006: [The eradication of African swine fever in Brazil, 1978-1984]. *Rev Sci Tech*, 25, 93-103.
- Malmquist, W. A., Hay, D., 1960: Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am J Vet Res*, 21, pp. 104-108.
- Martins, C. L., T. Scholl, C. A. Mebus, H. Fisch and M. J. Lawman, 1987: Modulation of porcine peripheral blood-derived macrophage functions by in vitro infection with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Viral Immunol*, 1, 177-190.
- Mebus, C. A., 1988: African swine fever. *Adv Virus Res*, 35, 251-269.
- Mellor, P. S., Kitching, R. P. and Wilkinson, P. J., 1987: Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Res Vet Sci*, 43(1), 109-112.
- Michaud, V., P. Gil, O. Kwiatek, S. Prome, L. Dixon, L. Romero, M. F. Le Potier, M. Arias, E. Couacy-Hymann, F. Roger, G. Libeau and E. Albina, 2007: Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *J Virol Methods*, 146, 257-265.
- Montgomery, R. E., 1921: On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *The journal of comparative pathology and therapeutics*, 159-191.
- Mur, L., A. Igolkin, A. Varentsova, A. Pershin, S. Remyga, I. Shevchenko, I. Zhukov and J. M. Sanchez-Vizcaino, 2014: Detection of African Swine Fever Antibodies in Experimental and Field Samples from the Russian Federation: Implications for Control. *Transbound Emerg Dis*.
- Mur, L., B. Martinez-Lopez, M. Martinez-Aviles, S. Costard, B. Wieland, D. U. Pfeiffer and J. M. Sanchez-Vizcaino, 2012: Quantitative risk assessment for the introduction of African swine fever virus into the European Union by legal import of live pigs. *Transbound Emerg Dis*, 59, 134-144.
- Murtaugh, M. P., M. J. Baarsch, Y. Zhou, R. W. Scamurra and G. Lin, 1996: Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet Immunol Immunopathol*, 54, 45-55.
- OIE, 2012: African swine fever.
- OIE, 2013a: African swine fever. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/AFRICAN_SWINE_FEVER.pdf.
- OIE, 2013b: African swine fever in Belarus. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000013663_20130624_102939.pdf.

- OIE, 2014a: African swine fever in Lithuania. Available at: http://www.oie.int/_2/temp/reports/en_imm_0000014690_20140127_143257.pdf.
- OIE, 2014b: African swine fever in Poland. Available at: <http://www.bpex.org/R-and-D/Pig-Health/documents/OIEimmediatenotificationreport-ASFPoland.pdf>.
- OIE, 2014c: African swine fever in Ukraine. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=14625 (2014).
- OIE, 2014d: Disease distribution map: African swine fever in domestic and wild pigs, January 2012 to June 2012. Retrieved 10th August 2014 from. World Animal Health Information Database of the World Organisation for Animal Health, <http://web.oie.int/>.
- OIE, 2014e: Event summary: African swine fever, Latvia. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review/viewsummary?reportid=15485.
- OIE, 2014f: Event summary: African swine fever, Poland. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review/viewsummary?reportid=15340.
- Oleaga-Pérez, A., R. Pérez-Sánchez, A. Astigarraga and A. Encinas-Grandes, 1993: Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by pig serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. *Vet Parasitol*, 52.
- Oura, C. A., L. Edwards and C. A. Batten, 2013: Virological diagnosis of African swine fever--comparative study of available tests. *Virus Res*, 173, 150-158.
- Oura, C. A., P. P. Powell, E. Anderson and R. M. Parkhouse, 1998a: The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J Gen Virol*, 79 (Pt 6), 1439-1443.
- Oura, C. A., P. P. Powell and R. M. Parkhouse, 1998b: African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J Gen Virol*, 79 (Pt 6), 1427-1438.
- Parker, J., W. Plowright and M. A. Pierce, 1969: The epizootiology of African swine fever in Africa. *Vet Rec*, 85, 668-674.
- Pastor, M. J., M. Arias and J. M. Escribano, 1990: Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am J Vet Res*, 51, 1540-1543.
- Pejsak, Z., M. Truszczynski, K. Niemczuk, E. Kozak and I. Markowska-Daniel, 2014: Epidemiology of African Swine Fever in Poland since the detection of the first case. *Pol J Vet Sci*, 17, 665-672.
- Penrith, M. L., G. R. Thomson, A. D. Bastos, O. C. Phiri, B. A. Lubisi, E. C. Du Plessis, F. Macome, F. Pinto, B. Botha and J. Esterhuysen, 2004: An investigation into natural resistance to African swine fever in domestic pigs from an endemic area in southern Africa. *Rev Sci Tech*, 23, 965-977.
- Perez-Filgueira, D. M., F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo, P. Resino-Talavan, E. Blanco, E. Gomez-Casado, C. Alonso and J. M. Escribano, 2006: Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Clin Microbiol*, 44, 3114-3121.
- Perez-Sanchez, R., Astigarraga, A., Oleaga-Perez, A., Encinas-Grandes, A., 1994: Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of *Ornithodoros erraticus* in the province of Salamanca, Spain. *Veterinary Record*, 135 (9), 207-209.
- Pini, A. and L. R. Hurter, 1975: African swine fever: an epizootiological review with special reference to the South African situation. *J S Afr Vet Assoc*, 46, 227-232.
- Plowright, W. and J. Parker, 1967: The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Arch Gesamte Virusforsch*, 21, 383-402.
- Plowright, W., J. Parker and M. A. Peirce, 1969: African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature*, 221, 1071-1073.

- Plowright, W., C. T. Perry, M. A. Peirce and J. Parker, 1970: Experimental infection of the argasid tick, *Ornithodoros moubata* porcinus, with African swine fever virus. *Arch Gesamte Virusforsch*, 31, 33-50.
- Plowright, W., G. R. Thomson and J. A. Naser, 1994: *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*. South Africa: Oxford University Press.
- Quintero, J. C., R. D. Wesley, T. C. Whyard, D. Gregg and C. A. Mebus, 1986: In vitro and in vivo association of African swine fever virus with swine erythrocytes. *Am J Vet Res*, 47, 1125-1131.
- Rodriguez, F., C. Alcaraz, A. Eiras, R. J. Yanez, J. M. Rodriguez, C. Alonso, J. F. Rodriguez and J. M. Escribano, 1994: Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J Virol*, 68, 7244-7252.
- Rodriguez, F., A. Fernandez, J. P. Martin de las Mulas, M. A. Sierra and A. Jover, 1996: African swine fever: morphopathology of a viral haemorrhagic disease. *Vet Rec*, 139, 249-254.
- Rousset, Randriamparany, M. Rahantamalala, Randriamahefa, Zeller, Rakoto-Andrianarivelo and Roger, 2001: [African Swine Fever introduction into Madagascar, history and lessons from an emergence]. *Arch Inst Pasteur Madagascar*.
- Rowlands, R. J., V. Michaud, L. Heath, G. Hutchings, C. Oura, W. Vosloo, R. Dwarka, T. Onashvili, E. Albina and L. K. Dixon, 2008: African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis*, 14, 1870-1874.
- Rowlands, R. J. M., V.; Heath, L.; Hutchings, G.; Oura, C.; Vosloo, W.; Dwarka, R.; Onashvili, T.; Albina, E.; Dixon, L.K., 2008: African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis*, pp. 1870–1874. CDC.
- Salas, M. L. and G. Andrés, 2012: African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.*, 173, 29-41.
- Salguero, F. J., P. J. Sanchez-Cordon, A. Nunez, M. Fernandez de Marco and J. C. Gomez-Villamandos, 2005: Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol*, 132, 289-302.
- Sanchez-Cordon, P. J., J. L. Romero-Trejejo, M. Pedrera, J. M. Sanchez-Vizcaino, M. J. Bautista and J. C. Gomez-Villamandos, 2008: Role of hepatic macrophages during the viral haemorrhagic fever induced by African Swine Fever Virus. *Histology and histopathology*, 23, 683-691.
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., B. Martínez-López, M. Martínez-Avilés, C. Martins, F. Boinas, L. Vial, V. Michaud, F. Jori, E. Etter, E. Albina and F. Roger, 2009: Scientific review on African Swine Fever; SCIENTIFIC REPORT submitted to EFSA.
- Sanchez-Vizcaino, J. M., L. Mur, J. C. Gomez-Villamandos and L. Carrasco, 2014: An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. *J Comp Pathol*.
- Sanchez-Vizcaino, J. M., L. Mur and B. Martinez-Lopez, 2012: African Swine Fever: An Epidemiological Update. *Transbound Emerg Dis*.
- Sanchez-Vizcaino, J. M., L. Mur and B. Martinez-Lopez, 2013: African swine fever (ASF): five years around Europe. *Vet Microbiol*, 165, 45-50.
- Schlafer, D. H. and C. A. Mebus, 1987: Abortion in sows experimentally infected with African swine fever virus: pathogenesis studies. *Am J Vet Res*, 48, 246-254.
- Sierra, M. A., J. C. Gomez-Villamandos, L. Carrasco, A. Fernandez, E. Mozos and A. Jover, 1991: In vivo study of hemadsorption in African swine fever virus infected cells. *Vet Pathol*, 28, 178-181.
- Sierra, M. A., M. Quezada, A. Fernandez, L. Carrasco, J. C. Gomez-Villamandos, J. Martin de las Mulas and J. M. Sanchez-Vizcaino, 1989: Experimental African swine fever: evidence of the virus in interstitial tissues of the kidney. *Vet Pathol*, 26, 173-176.

- Simeón-Negrín, R. E. and M. T. Frías-Lepoureau, 2002: *Eradication of African Swine Fever in Cuba (1971 and 1980)*, 14.04.2008 edn. WILEY.
- Takamatsu, H. D., L.K.; Alonso, C.; Escribano, J.M.; Martins, C.; Revilla, Y.; Salas, M.L. , 2011: Asfarviridae. *Virus Taxonomy*, pp. 153-162.
- Thomson, G. R., 1985: The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, 52, 201-209.
- Tignon, M., C. Gallardo, C. Iscaro, E. Hutet, Y. Van der Stede, D. Kolbasov, G. M. De Mia, M. F. Le Potier, R. P. Bishop, M. Arias and F. Koenen, 2011: Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J Virol Methods*, 178, 161-170.
- Turner and Williams, 1999: Laboratory-scale inactivation of African swine fever virus and swine vesicular disease virus in pig slurry. *J Appl Microbiol*.
- Villeda, C. J., S. M. Williams, P. J. Wilkinson and E. Vinuela, 1993: Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. *Arch Virol*, 133, 467-475.
- Wardley, R. C. and P. J. Wilkinson, 1978: The growth of virulent African swine fever virus in pig monocytes and macrophages. *J Gen Virol*, 38, 183-186.
- Wernike, K., B. Hoffmann and M. Beer, 2013: Single-tube multiplexed molecular detection of endemic porcine viruses in combination with background screening for transboundary diseases. *J Clin Microbiol*, 51, 938-944.
- Wilkinson, 1986: Epidemiology of African swine fever. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 5, 487-493.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASP	Afrikanische Schweinepest
ASPV	Afrikanische Schweinepest Virus
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie (engl. <i>disseminated intravascular coagulation</i>)
DIFT	direkter Immunfluoreszenztest
DNS	Desoxyribonukleinsäure (engl. DNA - <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNS	Doppelstrang-DNS
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EU	Europäische Union
FAO	<i>Food and Agriculture Organisation of the United Nations</i>
HAT	Hämaadsorptionstest
IFT	Immunfluoreszenztest
IIF	indirekte Immunfluoreszenzfärbung
IL	Interleukin
IPT	Immunperoxidasetest
KSP	Klassische Schweinepest
KSPV	Klassische Schweinepestvirus
NS	nicht-Strukturprotein
NT	Neutralisationstest
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit (franz. <i>Office International des Épizooties</i>)
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
q-PCR	Echtzeit Polymerasekettenreaktion (engl. <i>real-time PCR</i>)
spp.	<i>Species pluralis</i> , mehrere Spezies
TNF	Tumornekrosefaktor

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau des Afrikanischen Schweinepest Virus (Bioinformatics, 2008).	3
Abbildung 2: Verbreitung der Afrikanischen Schweinepest in der EU und in angrenzenden Ländern..	10
Abbildung 3: Übersicht über die Verteilung der 22 ASPV-Genotypen von 2003 bis 2008 (Costard et al., 2009).	11

11 DANKSAGUNGEN

Der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit wäre ohne die unschätzbare Hilfe, Motivation und Unterstützung einer Vielzahl von Menschen nicht möglich gewesen. Ein einfaches “Danke” genügt nicht, um meine tiefe Dankbarkeit auszudrücken.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Sutter und den Gutachtern für ihre Beurteilung dieser Arbeit danken.

Ein weiterer großer Dank geht an meinen Mentor Prof. Dr. Martin Beer.

Dr. Sandra Blome stand mir immer mit ihrem Fachwissen zur Seite und opferte viele freie Abende. Sie hat mich immer geduldig unterstützt, unermüdlich motiviert und auf diese Weise meine Arbeit vorangetrieben.

Ferner möchte ich ihrer Schwester Katrin Blome für die kritischen Rezensionen danken.

Mein Dank geht ebenfalls an die beteiligten Laboranten Ulrike Kleinert, Kristin Trippler, Holger Scholten und Laura Zoch. Sie führten mich in die Grundlagen der Laborarbeit ein und waren eine große, unschätzbare Hilfe. Eine große Stütze waren zudem die Kollegen und Mitarbeiter des Labors von Dr. Günther Keil und der nationalen Referenzlabore für MKS, BHV-1 und BT.

Für die Unterstützung während der Tierversuche möchte ich Dr. Elke Lange, Bärbel Hammerschmidt und Dr. Charlotte Schröder danken. Den Tierpflegern des FLI gebührt ebenfalls mein Dank, insbesondere Frank Klipp, Doreen Fiedler und Harald Manthei möchte ich hier erwähnen. Während der Sektionen waren die Pathologen des FLI mit ihrem Fachwissen und ihre Sektionshelfer eine unverzichtbare Stütze.

Ein weiterer Dank geht an das von der EU ins Leben gerufene ASFORCE-Projekt, welches meine Arbeiten finanziert hat. Den darin involvierten internationalen Partnern danke ich für die anregenden Diskussionen.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich bei meinen Vorhaben immer geduldig unterstützt haben.