

**Abschlussbericht
zum Projekt**

**Evaluierung des Eintragsrisikos der Afrikanischen
Schweinepest (ASP) in Schweinehaltungssysteme
mittels Modellierung**

Handlungsoptionen in der Schweinehaltung für eine sichere Produktion

Göttingen, 25.03.2024

Antragsteller

Prof. Dr. Imke Traulsen
M. Sc. Lena Kaatz
Georg-August-Universität Göttingen
Systeme der Nutztierhaltung
Department für Nutztierwissenschaften
Albrecht-Thaer-Weg 3
37075 Göttingen
imke.traulsen@uni-goettingen.de

Kooperationspartner

Prof. Nicole Kemper
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover,
Institut für Tierhygiene, Tierschutz und
Nutztierethologie (ITTN)
Bischofsholer Damm 15 - Gebäude 116
30173 Hannover
nicole.kemper@tiho-hannover.de

Zusammenfassung

Mit einer vergleichsweise hohen Letalität von bis zu 100 % (FLI 2021) wird die Afrikanische Schweinepest (ASP) aktuell als die weltweit verheerendste Schweinekrankheit bezeichnet (Njau et al., 2021). Da der Erreger sehr umweltstabil ist und über kontaminierte Futtermittel, Fahrzeuge, Kleidung und Werkzeuge übertragen werden kann, gelten diese als mögliche Vektoren zur Übertragung in Hausschweinebestände (Guinat et al., 2016). Das Forschungsvorhaben zielte auf die Quantifizierung von Eintragsrisiken der ASP in Haltungssysteme beim Schwein sowie die Betrachtung der Ausbreitung innerhalb des Bestandes ab. Es wurden Fluoreszenz-Farbstoffe als Modell genutzt mit dem Ziel, das Afrikanische Schweinepest-Virus (ASPV) nachzuahmen und Übertragungsversuche zu ermöglichen, ohne das Virus *per se* zu verwenden. Auf Basis einer intensiven Literaturrecherche zu Beginn des Projekts wurden Durchführungsprotokolle und Routinen zur Anwendung und Dokumentation von zwei Fluoreszenz-Farbstoffen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten entwickelt. In der Literatur war kein Protokoll für die Anwendung des Farbstoffes verfügbar. Versuche unter kontrollierten praktischen Bedingungen zeigten, dass sich der Farbstoff 1 über unbelebte Vektoren wie Schuhwerk und Reifen in einem Bereich von bis zu 2-6 m austragbar und in Kombination mit systematischen Bildaufnahmen so Ausbreitungswege quantitativ und qualitativ nachverfolgbar darstellbar sind. Der Farbstoff 2 ist als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen und wurde in einem praktischen Versuch in einem Schweinehaltungssystem angewendet. Intensive Versuche zeigten, dass eine Übertragung von Tier zu Tier mit dem Farbstoff nicht möglich war. Auch unter Zuhilfenahme vielfältiger Trägermittel konnte sich der Farbstoff nicht längere Zeit auf der Haut halten oder nachvollziehbar zwischen Tieren übertragen werden. Eine Infektionskette zwischen den Tieren ließ sich nicht visualisieren.

Zusammenfassend ist somit festzuhalten, dass der Fluoreszenz-Farbstoff 1 geeignet ist, quantitativ und qualitativ Übertragungswege durch Gegenstände nachzuvollziehen und zu visualisieren, während für die Anwendung am Tier die Arbeiten zu keiner in der landwirtschaftlichen Praxis anwendbaren Lösung geführt haben. Die Ergebnisse zeigten jedoch das große Potential der Fluoreszenzfarbstoffe, Schwachstellen sowie unbewusste Fehler bei Biosicherheitsmaßnahmen zu visualisieren und auch Reinigungserfolge in landwirtschaftlichen Tierhaltungen zu kontrollieren. Die Ergebnisse stellen einen besonderen Neuheitswert im Bereich der Infektionsforschung dar und sind auch auf andere Erreger als das ASPV übertragbar. Vergleichbare Arbeiten sind nicht bekannt. Die eingesetzten Fluoreszenz-Farbstoffe gehen somit als ein potenzielles Tool aus den Untersuchungen hervor, die in der Praxis zur Schulung und für Anschauungszwecke eingesetzt werden könnten. Sie sind geeignet, das Risiko der Einschleppung von infektiösen Erregern, wie z. B. des Virus der ASP, in landwirtschaftliche Nutztierhaltungen via unbelebter Vektoren qualitativ zu bewerten.

Zielsetzung

Seit 2007 breitet sich die Afrikanische Schweinepest (ASP) vermehrt in Europa und Asien aus (FLI 2021). In Deutschland wurden seit dem ersten Ausbruch in 2020 bis März 2024 mehr als 5.660 Ausbrüche amtlich bestätigt, von der Infektionskrankheit waren bislang 5.653 Wildschweine und 8 Betriebe mit Hausschweinen betroffen (TSIS 2024). Da der Erreger sehr umweltstabil ist und über kontaminierte Futtermittel, Fahrzeuge, Kleidung und Werkzeuge übertragen werden kann, gelten diese als mögliche Vektoren zur Übertragung in Hausschweinebestände (Guinat, et al., 2016). Das Forschungsvorhaben zielte daher auf die Quantifizierung von Eintragsrisiken der ASP in unterschiedliche Haltungssysteme in der praktischen Schweinehaltung ab. Das Risiko eines initialen Eintrags durch die benannten möglichen Übertragungswege nach Guinat et al. (2016) sollte ebenso wie die Ausbreitung innerhalb des Bestandes evaluiert werden. Aus den Untersuchungen sollte eine Ableitung von Handlungsempfehlungen für die Erhöhung der Biosicherheit in der landwirtschaftlichen Praxis ermöglicht werden.

Planung und Ablauf

Das Projekt gliederte sich in die drei Teile (1) Vorarbeiten, (2) Datenaufnahme, (3) Auswertungsphase und Publikation. Teil 1 und 3 konnten gemäß Projektplan durchgeführt werden, während sich in Teil 2 zur Projektlaufzeit Änderungen im Vorgehen ergeben haben (vgl. Zwischenbericht April 2023). Für die experimentelle Arbeit musste zunächst ein Anwendungsprotokoll erarbeitet werden, da in der Literatur kein entsprechendes verfügbar war. Im Projektverlauf zeigte sich, dass die breit angelegte Datenaufnahme auf landwirtschaftlichen Praxisbetrieben nicht realisierbar war (vgl. Zwischenbericht). Zur Erreichung der Projektziele wurden einzelne gezielte Experimente durchgeführt, um die Eignung zweier Farbstoffe mit unterschiedlichen Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten zur Bewertung von Übertragungswegen des ASPV zu untersuchen. Diese Anpassung in den Projektarbeiten begründete sich insbesondere dadurch, dass keine Genehmigung des Einsatzes von Fluoreszenzfarbstoff 1 im landwirtschaftlichen Betrieb erteilt wurde (vgl. LAVES) und Fluoreszenzfarbstoff 2 nicht von Tier zu Tier übertragbar war.

Durch zeitliche Verzögerungen zu Beginn des Projektes (Einstellung Projektpersonal, vgl. Zwischenbericht 2023) wurde das Projekt kostenneutral bis zum 31.01.24 verlängert. Die Projektziele zur Ableitung von Empfehlungen zur qualitativen Bewertung der Biosicherheit auf landwirtschaftlichen Betrieben mittels Fluoreszenzfarbstoffs wurden erreicht.

Material und Methoden

Die Arbeiten im Projekt gliederten sich in drei Arbeitsabschnitte: Die Entwicklung des Anwendungsprotokolls, Risikobewertung von unbelebten Vektoren, z. B. Schuhe oder Reifen, und die Risikobewertung anhand der Tier-zu-Tier Übertragung.

Entwicklung eines Anwendungsprotokolls

Zur Entwicklung eines Anwendungsprotokolls von Fluoreszenzfarbstoffen in der Schweinehaltung wurde sowohl auf Literatur aus der Humanmedizin und der Forensik (u. a. Newsom et al., 2022 und Scanlon 1973) als auch auf Erfahrungen aus dem Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie (ITTN) der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zurückgegriffen. Das Protokoll wurde zunächst unter Labor- und anschließend unter praxisnahen Außenbedingungen getestet. Berücksichtigt wurde dabei die UV-Stabilität, die Anwendbarkeit unter Realbedingungen und die fluoreszierenden Eigenschaften von zwei Fluoreszenz-Farbstoffen (folgend unterschieden in Farbstoff 1 der Firma Roth¹ und Farbstoff 2 der Firma FluoTechnik²). In Anlehnung an Miranda et al. (2014) wurden die Farbstoffe als Ersatz für das Virus bzw. infektiöses Material eingesetzt. Die Versuche der praktischen Szenarien zum Reifen und zum Schuhwerk auf Flächen im Außenbereich wurden in einem beschrifteten Raster durchgeführt (s. Abb. 1, Vgl. Phan et al., 2018). Anhand von Fotos wurde die räumliche und zeitliche Ausbreitung des Farbstoffes in bestimmten Rasterflächen dokumentiert. Eine Kamera wurde in der Höhe von 120 cm auf ein Stativ montiert (vgl. Miranda et al., 2014) und so die Distanz zwischen Aufnahme und Versuchsfläche standardisiert (Fiedler et al., 2008). Die Auswertung dieser Fotos erfolgte mit der Software ImageJ (Schneider 2012, Miranda et al., 2014).

Das Ergebnis dieses Schrittes bildete die Grundlage für die weiteren Projektarbeiten zur qualitativen und quantitativen Bewertung der Erregerübertragung von unbelebten und belebten Vektoren.

Risikobewertung von unbelebten Vektoren

Der Mensch ist die bedeutendste Eintragsquelle von ASPV in einen tierhaltenden Bestand. Daher wurde die Einschleppung eines Erregers in eine Schweinehaltung über den Menschen anhand von Farbstoff-Anhaftungen an Schuhen und Reifen modelliert. Dabei wurde ebenfalls eine Verladesituation von Tieren auf einen Transporter betrachtet. Verwendet wurde hier der Farbstoff 1. Diese Versuche, welche bis zu fünfmal wiederholt wurden, entsprachen typischen Situationen (Szenarien) aus der landwirtschaftlichen Praxis und konnten ohne Tierkontakt stattfinden.

Als grundlegender Aufbau wurde die Versuchsfläche von 6 m² in gleichgroße Bereiche (1 x 1 m) unterteilt und diese mit Kreide auf dem Boden markiert (s. Abb. 1a), welche den Außenbereich um einen schweinehaltenden Betrieb modellhaft darstellen sollte.

¹ Fluorescein-Natrium der Firma Roth, C. I. 45350, C₂₀H₁₀Na₂O₅, Molekulargewicht 376,28 g/mol, Artikelnummer: 5283.

² Lebensmittelkennzeichnungsfarbe - DETECT+ YELLOW ALIM UV der Firma FluoTechnik, Artikelnummer: DY.ALIM.UV.100G.

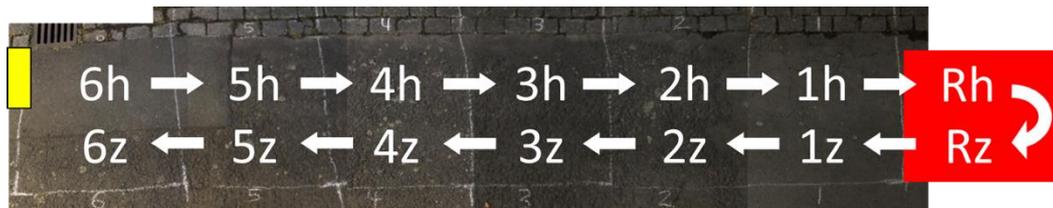


Abbildung 1a: Foto der Versuchsfläche.

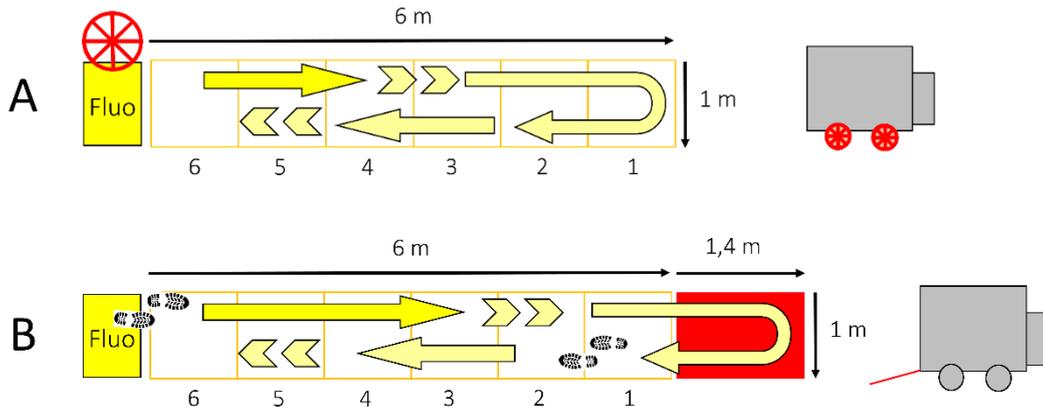


Abbildung 1b: Schematischer Aufbau der Versuchsfläche und Wegführung mit Vektor „Reifen“ (A) und „Schuh“ inklusive Verloaderampe (B).

Ausgehend von Startpunkt „6h“ wurde sich auf einem Rundweg mit Schuhen bzw. Reifen in einer konstanten Geschwindigkeit bis zum Endpunkt der Fläche („Rh“) und daneben parallel zurückbewegt (s. Abb. 1b von „Rz“ zu „6z“). Für den Versuch mit Schuhen wurden Stiefelüberzieher (typische Einweghygienekleidung) über den Schuhen verwendet, als Modell für einen Reifen wurde aufgrund der Praktikabilität ein Fahrradreifen genutzt. Die Schuhe/der Reifen wurden am Punkt „Fluo“ mit einer 1%-igen Lösung des Farbstoff 1 benetzt und über die Versuchsfläche bewegt. Bei dem Versuch mit Schuhwerk wurde zusätzlich (Rh, Rz) eine Metallplatte hinzugezogen, die eine Ladeklappe simulierte.

Die Bilder eines Durchgangs wurden mit der Software ImageJ qualitativ und quantitativ ausgewertet. Für die quantitative Auswertung wurde in der Software die Schwellen der RGB-Farbbereiche der Bilder angepasst und so mit einem standardisierten Bereich ausgewertet. Die Anzahl der so markierten Pixel stellte das quantitative Ausmaß der Übertragung des Fluoreszenzfarbstoffs dar. Für die einzelnen Parzellen des Versuchsareals wurde die Anzahl der fluoreszierenden Pixel berechnet und in einer Excel-Tabelle zusammengetragen und anhand eines Diagramms dargestellt. Hierbei handelt es sich um eine neu entwickelte Anwendung. Die Software findet bisher für gewöhnlich in der Mikrobiologie Verwendung, um u. a. Bakterienkolonien auszuzählen. Sie wurde in Anlehnung an Miranda et al. (2014) weiterentwickelt.

Für die qualitative Auswertung der Bilder wurde die Fluoreszenz auf den Bildern der Parzellen in eine von fünf Kategorien eingeteilt (0-4; 0 = keine Fluoreszenz; 4: sehr viel Fluoreszenz).

Die Ergebnisse wurden ebenfalls in einer Excel-Tabelle zusammengetragen und deskriptiv ausgewertet.

Risikobewertung Tier-zu-Tier Übertragung

Für Erhebungen im Tierbestand konnte aufgrund von Zulassungsbeschränkungen lediglich der Farbstoff 2 verwendet werden. Aufgrund der mangelnden Evidenz zur Durchführung in einer tierhaltenden Umgebung wurde keine Zulassung für den Farbstoff 1 erteilt (vgl. Kommunikation Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)). Die Versuche fanden in der Schweinehaltungsanlage auf dem Versuchsgut Hohenschulen der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Genehmigung des Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel statt. Die Experimente auf dem Versuchsgut stellen nach unserem Wissen den erstmaligen Einsatz eines Fluoreszenz-Farbstoffs in der Haltungsumwelt von landwirtschaftlichen Nutztieren dar. Ein Abteil bestand aus 2x5-Buchten, die durch einen Gang voneinander getrennt waren. In jeder Bucht befanden sich fünf Aufzuchtschweine. Im Versuch wurde ein Aufzuchtschwein in einer Bucht mit dem Farbstoff 2 (Konzentration: 0,5 g/ L) angesprüht und die Übertragung zu anderen Schweinen in derselben Bucht beobachtet und dokumentiert.

Ergebnisse und Diskussion

Entwicklung eines Anwendungsprotokolls

Die Versuche mit dem Farbstoff 1 zeigten, dass die emittierte Fluoreszenz des frisch ausgetragenen Farbstoffs auf trockener Fläche über eine Strecke von 2-6 m unter Schwarzlicht (UV-Licht) mit dem bloßen Auge zu beobachten war, ebenso konnten kleinere Tröpfchen wahrgenommen werden.

Die UV-Stabilität des Farbstoffs 1 war in den durchgeführten Vorversuchen sehr hoch. Selbst nach dem vollständigen Austrocknen und erneuter Zugabe von Leitungswasser, zeigte der Farbstoff erneut Fluoreszenz (s. Abb. 2). Diese „Reaktivierung“ des Farbstoffs war vielversprechend, es einerseits zeitliche Flexibilität bei der Aufnahme der Bilder schaffte und andererseits auch Langzeitversuche möglich wären. Zusätzlich zeigten die Versuche, dass Farbstoff 1 auf der Haut für 24 Stunden oder länger Fluoreszenz emittieren kann und die Haut keinen Farbstoff überträgt, nachdem diese gewaschen und abgetrocknet wurde, auch wenn die Haut weiterhin fluoresziert (Scanlon 1973). Während die Aussage, dass der Farbstoff auf der Haut verbleibt, auf den Farbstoff 1 zutrifft, war das für den Farbstoff 2 nicht der Fall.

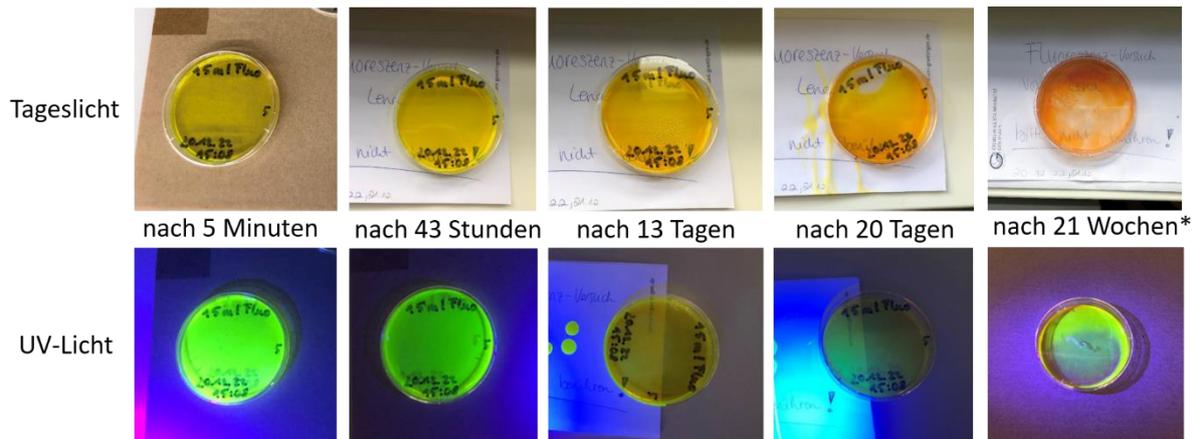


Abbildung 2: Fluoreszenz des Farbstoffs 1 im Verlauf von 21 Wochen bei Tageslicht (oben) und bei UV-Licht (unten), *: erneute Zugabe von Wasser.

Risikobewertung von unbelebten Vektoren

Die Versuche der praktischen Experimente ergaben, dass der Farbstoff 2 in Gebrauchslösung auf feuchtem Untergrund bzw. feuchten Gegenständen eine niedrigere Fluoreszenz zeigte als Farbstoff 1. Die folgenden Abbildungen stellen den Farbstoff 1 in den Szenarien dar (s. Abb. 4 und 5). Dieser konnte in diesem Zusammenhang erfolgreich angewendet werden, da sich der Farbstoff verteilen und anhand von UV-Licht und Bildern dokumentieren ließ. Es konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass die Übertragung kontaminierter Matrizen über unbelebte Vektoren visualisiert werden kann. Auch die Abnahme des Grades der Fluoreszenz im räumlichen/ zeitlichen Verlauf ist eindrücklich festzustellen. Da der Farbstoff austrocknen kann und in diesem Zustand nicht mehr übertragen wird, ist dies eine Limitation, die auf das ASPV nicht zutrifft. Das allgemeine Risiko, dass Erreger unbemerkt über die Gegenstände verschleppt werden, ist hoch. Wie auch das ASPV ist der Farbstoff erst einmal nicht sichtbar. Der Farbstoff wurde räumlich weiter ausgetragen als erwartet. Somit wird das geschätzte Risiko der Übertragung durch unbelebte Vektoren wie dem Schuhwerk aber auch Reifen um diesen Faktor verzerrt bzw. unterschätzt. Der Farbstoff, wie auch das ASPV, wird unbewusst weiter ausgetragen als mit dem Auge wahrgenommen.

Die qualitativen und quantitativen Ergebnisse anhand der Software ImageJ bestätigte die Vermutung, dass die Fluoreszenz nachlässt, je länger die Strecke ist (s. Abb. 6). Besonders zu beachten ist, dass die qualitative Auswertung anhand von vier Kategorien zeigte, dass die Fluoreszenz auf der Platte („Verladerampe“) deutlicher zu vernehmen war, während die Auswertung via ImageJ dieses Ergebnis nicht widerspiegelt. Die Diagramme zeigen, dass sich der Farbstoff 1 etwa 9-10 m unter den gegebenen Bedingungen beobachten lässt (eine Parzelle entspricht etwa 1 m Ausbreitung anhand des entsprechenden Vektors).

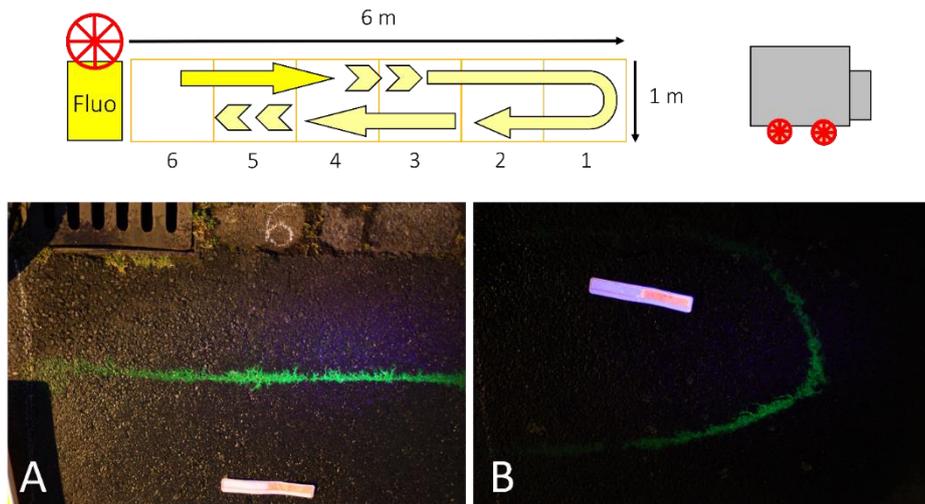


Abbildung 4: Aufbau und praktische Einblicke Szenario Reifen, abgebildet werden die Parzelle „6h“ (A) und die Parzelle „1“ (B).

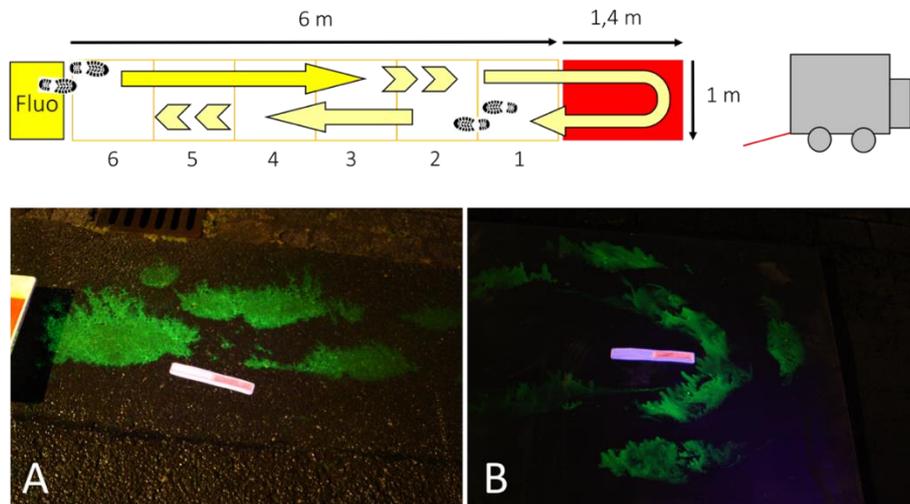


Abbildung 5: Aufbau und praktische Einblicke Szenario Laderampe und Schuhwerk, abgebildet werden die Parzellen „6h“

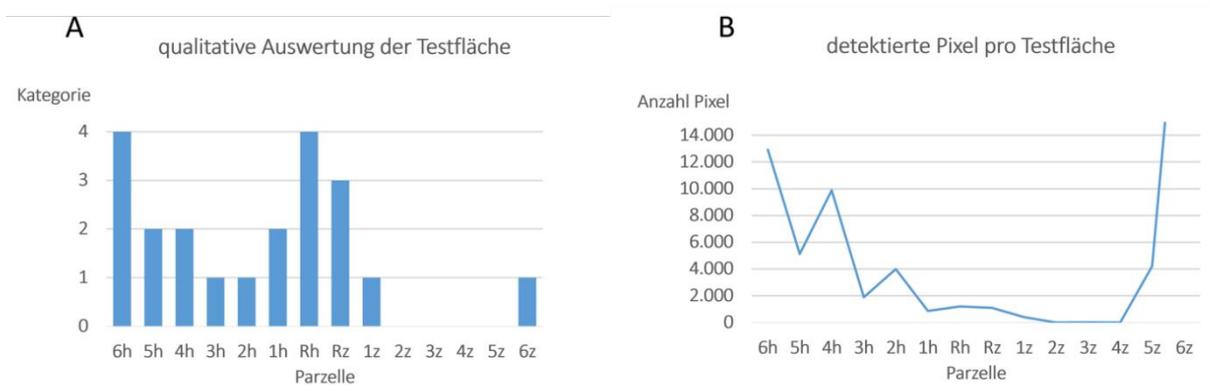


Abbildung 6: Ergebnisse der qualitativen (A) und quantitativen (B) Auswertung für das Szenario „Rampe“ über das Versuchsraster mit sechs Felder (Nummerierung der Felder von 6-1, R: Rampe, h: Hinweg, z: Rückweg, 0-4: keine bis sehr viel Fluoreszenz).

Der Peak auf der Rampe (Rh, Rz) (Abb. 6; A) in der qualitativen Auswertung lässt sich durch die geringe Absorptionsfähigkeit des Untergrunds erklären. Die Platte nimmt weniger Farbstoff auf und die Fluoreszenz zeigt sich vergleichsweise stark. Zudem gibt es keine Bodenfugen, die den Farbstoff aufnehmen, sodass die mit dem Auge beobachtete Fluoreszenz stärker wahrgenommen wird. Auch ein Verdünnungseffekt durch ein ggf. vorhandenes Wasserreservoir in den Spalten aufgrund des angefeuchteten Untergrunds ist nicht aufgetreten. Die Ergebnisse der Analyse mit ImageJ zeigten diesen Effekt nicht (Abb. 6; B), was sich vermutlich auf die Beleuchtung der Versuchsfläche zurückführen lässt. Die Außenfläche wurde ab Dämmerung beleuchtet, sodass diese Beleuchtung mit einem gewissen Gradienten von der Fläche 6 bis zur Fläche 1 und der Rampe abgenommen hat. Die Fluoreszenz wurde durch die Beleuchtung auf den Bildern verzerrt dargestellt. Um diesen Effekt weiter zu untersuchen, wären weitere Wiederholungen der Versuche notwendig. Daher könnten sich die Peaks in Abb. 6 (Grafik A Parzelle 1h-Rz, Grafik B Parzelle 5z-6z) möglicherweise als Ausreißer identifizieren. Weiterführende Versuche bieten das Potential dieses Auswertungsprotokoll weiterzuentwickeln.

Risikobewertung Tier-zu-Tier Übertragung

Anhand des Farbstoffs 2 wurden Versuche mit einem Fluoreszenz-Farbstoff in der Tierhaltungsumgebung durchgeführt. Die Ergebnisse stellten sich anders dar als erwartet. Der Farbstoff 2 konnte gut auf einem Tier detektiert werden (s. Abb. 7; A), eine Übertragung des Farbstoffs 2 auf andere Tiere in der Bucht wurde jedoch nicht beobachtet. Zudem ist dieser Fluoreszenz-Farbstoff nach zwei Minuten auf dem angefärbten Tier nicht mehr zu erkennen (s. Abb. 7; B).

In einem weiteren Versuch wurde die Flanke eines Tieres mit dem Farbstoff benetzt, eine Übertragung konnte mit dem Auge beobachtet werden, jedoch nicht im Kamerabild festgehalten werden. Tests zur Modifikation des Farbstoffs durch alternative Trägermedien (Rapsöl, Gleitmittel und Vaseline) brachten keine Verbesserung der Ausbreitungszeit des Farbstoffs. Beim Trägermedium Rapsöl wurde die Übertragung von dem angefärbten Tier auf ein anderes Tier innerhalb von zwei Minuten beobachtet (s. Abb. 8), führte jedoch dazu, dass die Tiere den Farbstoff oral aufnahmen, als die Tiere das angesprühte Tier mit Nase und Maul untersuchten

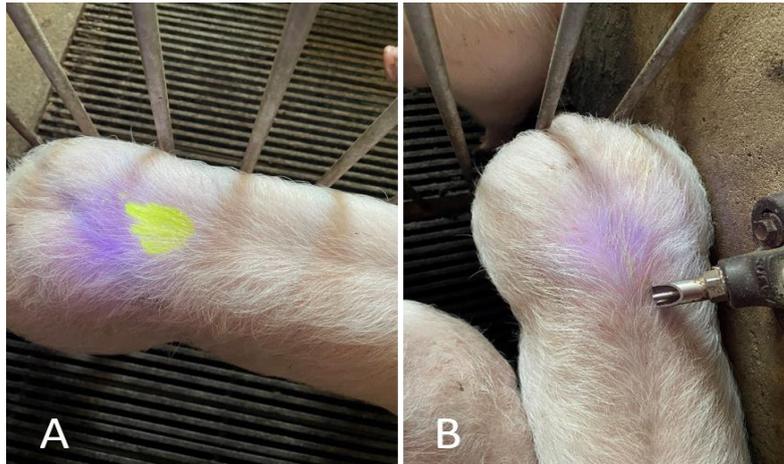


Abbildung 7: Aufgesprühter Farbstoff 2 auf den Rücken von Tier 1 an Zeitpunkt 0 (A) und Tier 1 nach zwei Minuten (B) unter der Beleuchtung von UV-Licht (lila-blau), auf dessen Rücken die Fluoreszenz (gelblich) lediglich an den Borsten zu erkennen verbleibt.

Die Fluoreszenz ließ sich vom Gang des Abteils weder beobachten noch dokumentieren, sodass sich die Dokumentation des Farbstoffs am Tier als schwierig herausstellte.

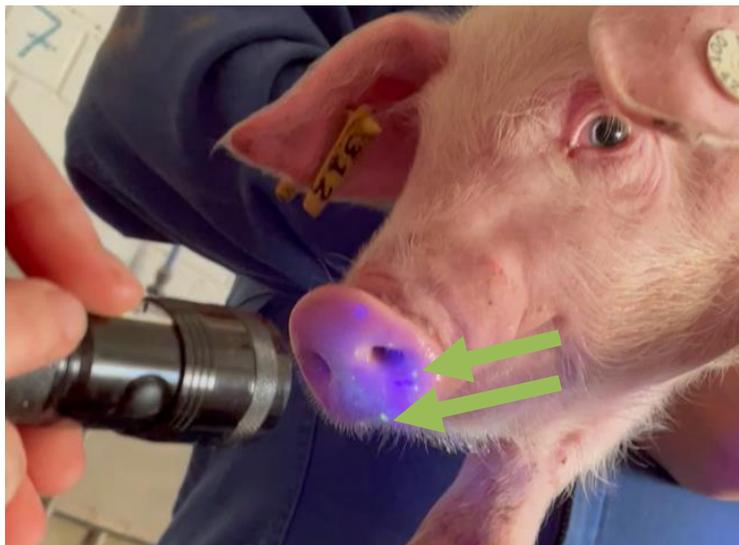


Abbildung 8: Fluoreszenz innerhalb von zwei Minuten nach der Übertragung zu erkennen auf der Rüsselscheibe eines Schweins, gekennzeichnet durch zwei Pfeile, die die Farbstoff-Punkte markieren.

Dementsprechend waren die Versuche in der Haltungsumgebung am Tier nicht wie geplant durchführbar. Anschließend wurden zahlreiche Alternativen evaluiert. Als weitere Option wurde eine stärkere UV-Quelle in Betracht gezogen, welche allerdings keine besseren Aufnahmen zu erwarten gehabt hätte. Eine höhere Konzentration des Farbstoffs war ebenfalls keine Option, da es sich bereits um die Maximalkonzentration handelte, die vom Hersteller zur Anwendung empfohlen wurde.

Somit muss hier festgehalten werden, dass die Versuche am Tier im Rahmen des Projektes zu keiner Lösung geführt haben. Auch der Einsatz von „nicht-toxischen“ Bakterienstämmen

oder Lebensmittelfarbstoffen sind keine alternativen Möglichkeiten. Auf Basis der Projektergebnisse werden folgende Weiterentwicklungen empfohlen. Zur Abschätzung des Übertragungsrisikos sind Videoaufnahmen eine Option, um die Kontakte zwischen Tieren zu untersuchen (Kosowska et al., 2023). Dies hätte zudem den Vorteil, dass diese Methode nicht-invasiv und objektiv reproduzierbar wäre. Die Tiere werden in ihrem Verhalten nicht beeinflusst. Hier könnte zudem die computergestützte Auswertung von Tierkontakten hinsichtlich Infektionsstudien in den Fokus rücken und die Grundlage für Simulationsstudien zur Ausbreitung von Infektionskrankheiten bilden. Für Versuche mit dem Fluoreszenz-Farbstoff lässt sich festhalten, dass quantitative Bild-Auswertungen via der Software ImageJ weiterentwickelt werden sollte. Auch hier bieten computergestützte Verfahren ein großes Potenzial.

Zur Anwendung in der landwirtschaftlichen Praxis ist die qualitative Auswertung der Versuche anhand von definierten Kategorien zu empfehlen. Diese liefern ausreichend Informationen, um die Bewertung der Reinigung von bspw. Stiefeln, schwer zugänglichen Stellen oder der Prüfung von Biosicherheitsmaßnahmen in Tierhaltungen vorzunehmen. Die qualitative Auswertung anhand von drei oder fünf Kategorien ist mit geringem Aufwand durchgeführt und könnte in der Praxis dazu dienen, auf Betrieben bestimmte Biosicherheitsmaßnahmen, wie z. B. Schwarz-Weiß-Bereiche, den praktizierenden Landwirt:innen und den Mitarbeiter:innen näher zu bringen und ggf. eingeschlichene Praktiken aufzudecken oder der Bedeutung von solchen Maßnahmen ins Bewusstsein zu rufen.

Als Limitation ist festzuhalten, dass Kleinstmengen eines Fluoreszenz-Farbstoffs, die vom Auge nicht mehr gesehen werden in diesem Maße bei ASPV allerdings schon ausreichend sein könnten, um Infektionen auszulösen. Daher spiegelt die Ausbreitung des Farbstoffs nicht zwangsläufig die Ausbreitung der ASP wider. Mit dem Farbstoff können großflächig kontaminierte Gegenstände untersucht werden. Für Aussagen über das Überleben von kleinsten infektiösen Matrizen sind nicht möglich.

Als Ergebnis aller durchgeführten Versuche lässt sich festhalten, dass der Farbstoff 1 in der Lage ist, die Effektivität von Biosicherheitsmaßnahmen in nutztierhaltenden Betrieben aber außerhalb der Reichweite von Tieren abzuschätzen. Der Farbstoff 2 kann für Abschätzungen in Bereichen des Betriebs angewendet werden, in denen Tiere möglicherweise in Kontakt mit dem Farbstoff kommen könnten. Es wurde jedoch kein Farbstoff gefunden, der Kontakte zwischen Tieren sichtbar macht und so eine Übertragung von Erregern simuliert. Diese Erkenntnisse bilden die Basis für zukünftige Studien um aus tierschutzrechtlicher und praktischer Sicht Fluoreszenzfarbstoffe einzusetzen und dabei Risiken für Tier oder Landwirt:innen zu berücksichtigen.

Ausblick zum Einsatz in der landwirtschaftlichen Praxis

Vergleich der Farbstoffe

Der Farbstoff 1 bietet die Möglichkeit, als innovatives Tool einen Einsatz in der Schulung für Biosicherheitsmaßnahmen bzw. der Prävention von Infektionskrankheiten in Bereichen ohne direkten Tierkontakt Anwendung zu finden. Diese Versuche könnten mit einer qualitativen Auswertung schnell und ohne allzu großen Aufwand zu Ergebnissen führen, das Bewusstsein für Hygienemaßnahmen schärfen und Schwachstellen bei Biosicherheitsmaßnahmen visualisieren.

Aufgrund der kurzen Beständigkeit und der fehlenden Übertragung des Farbstoffes erscheint die praktische Anwendung des Farbstoffs 2 in einem landwirtschaftlichen Betrieb derzeit nicht empfehlenswert für die Untersuchung von Tierkontakten. Stattdessen wird auf andere Methoden wie Kontaktanalysen aus Videomaterial gepaart mit Übertragungsmodellen verwiesen. Die beschriebenen Versuche stellen eine solide Grundlage für weitere Versuche dar, in denen die Vorteile des Farbstoffs 1 genutzt und die Nachteile des Farbstoffs 2 ausgeschlossen werden könnten (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Vor- und Nachteile der beiden verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe 1 und 2.

Farbstoff	1	2
Name	Fluorescein-Natrium der Firma Roth	Lebensmittelkennzeichnungsfarbe DETECT + UV YELLOW ALIM der Firma FluoTechnik
Vorteil	<ul style="list-style-type: none"> starke Fluoreszenz bei niedriger Konzentration in wässriger Lösung kann über Kanalisation entfernt werden (< 3 %-Lösung) nicht als gewässergefährdend eingestuft gemäß 1272/2008/EG (Sicherheitsdatenblatt Firma Roth) 	<ul style="list-style-type: none"> Zulassung als Lebensmittelzusatzstoff schwache Fluoreszenz in wässriger Lösung einfach zu reinigen nicht umweltschädlich, sofern Konzentration nach Herstellerangabe
Nachteil	<ul style="list-style-type: none"> hält sich hartnäckig in Fugen nach Trocknung nicht für den Einsatz im Tierbereich zugelassen 	<ul style="list-style-type: none"> in Pulverform Verwendung nicht nach Herstellerangabe Anwendung im Tierstall möglich

Für die Betrachtung der Infektionsausbreitungen von Tier-zu-Tier sollte sich in auf alternative Methode konzentriert werden. So wäre die Abschätzung von Übertragungsrisiken zwischen Tieren auf Basis von Tierkontaktinformationen aus Videobildern eine aufnahmen eine nicht-

invasive und objektiv reproduzierbare Option. Computergestützte Analyseverfahren bieten sowohl für die Auswertung von Videobilddaten als auch Bilder des Fluoreszenzfarbstoffs Weiterentwicklungspotential.

Mögliche Anwendungen in der landwirtschaftlichen Praxis

Ein denkbares Szenario wäre die Untersuchung des Schwarz-Weiß-Bereichs mit dem Farbstoff 1, um zu demonstrieren, wie sich Erreger in den Stall eintragen lassen und wie bedeutend ein Wechsel des Schuhwerks und dementsprechend ein Schwarz-Weiß-Bereich sein kann. Da sich diese Bereiche i. d. R. gut reinigen lassen und der Farbstoff sich leicht abspülen lässt, ist Farbstoff 1 hier als probates Mittel zu empfehlen, um das Bewusstsein hinsichtlich des Schwarz-Weiß-Bereichs zu steigern. Der Aufbau und die Durchführung wären recht simpel und ohne großen Aufwand durchzuführen. Falls es lediglich um das Schaffen des Bewusstseins oder dem Aufzeigen von Lücken bezüglich Biosicherheitsmaßnahmen geht, müssten die Versuche nicht zwangsläufig anhand von Fotos dokumentiert werden und ließen sich durch eine qualitative Auswertung – wie sie in den beschriebenen Versuchen durchgeführt wurde – analysieren.

Eine solche Anwendung wäre sowohl im Bereich Reinigung als auch im Bereich der Jagd im Kontext mit ASP-Prävention interessant, um dort ebenfalls das Bewusstsein für Biosicherheitsmaßnahmen zu schärfen. Dazu könnte der Farbstoff bspw. vor der Reinigung ausgebracht werden, um nach der Reinigung mit UV-Licht zu kontrollieren, inwiefern die Reinigungsmaßnahme richtig durchgeführt wurde und dafür sensibilisieren, auch z. B. schwer zugängliche Bereiche zu säubern oder gar gründlich zu reinigen.

Einhaltung des Kostenplans

Zur Deckung der entstehenden Kosten wurde von den beteiligten Projektpartnern ein hoher Eigenanteil erbracht. Vom bewilligten Kostenrahmen des QS-Wissenschaftsfonds wurden insgesamt 29.452,07€ abgerufen, um die Personalmittel der Projektmitarbeiterin Frau Lena Kaatz anteilig zu decken. Damit lagen die Mittelabrufe im Budget, Anpassungen waren nicht notwendig.

Beteiligte Institutionen und Austausch

Im Zuge der Projektarbeiten fand mit folgenden Institutionen, welchen wir herzlich danken, ein intensiver inhaltlicher Austausch statt:

- Georg-August-Universität Göttingen: Dr. Rafael Hernán Mateus-Vargas war Ansprechpartner mit veterinärmedizinischem Hintergrund, der mit seiner Expertise die praktischen Versuche mit dem Fluorescein begleitete und wertvolle Hinweise sowohl zur Durchführung der Versuche als auch zur Auswertung der generierten Daten gab.
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI): Dr. C. Sauter-Louis vom Institut für Epidemiologie und steht dem Projekt als Expertin für die Epidemiologie der ASP zur Seite.
- Max-Planck-Institut für Dynamik und Selbstorganisation: Prof. Dr. V. Priesemann stand als Ansprechpartnerin hinsichtlich der Modellierung der Ausbreitung der ASP zur Verfügung. Frau Prof. Dr. Priesemann untersuchte sowohl die Ausbreitung von SARS-CoV-2 als auch die Wirksamkeit von Interventionen und Eindämmungsstrategien.

In Bearbeitung befindlicher Qualifikationsarbeiten

Im Oktober 2022 hat Frau Lena Kaatz die Arbeiten zu ihrem Promotionsvorhaben aufgenommen (Arbeitstitel: Modellierung der Afrikanischen Schweinepest – Untersuchung und Simulation des Eintragsrisikos, der Ausbreitung und der Bekämpfung in deutschen Schweinehaltungssystemen). Es handelte sich dabei um die Untersuchung und die Simulation des Eintragsrisikos, der Ausbreitung und der Bekämpfung in deutschen Schweinehaltungssystemen. Ziel ist es, anhand eines entwickelten Netzwerk-Modells die Ausbreitung der ASP innerhalb eines Betriebs vorherzusagen, Bekämpfungsmaßnahmen auf ihre Effektivität zu untersuchen und die Höhe von auftretenden Schäden zu evaluieren. Dieses Projekt ist Teil des Promotionsvorhabens und soll in einem wissenschaftlichen Artikel veröffentlicht werden.

Zudem wurde im Wintersemester 2023/2024 eine Bachelorarbeit von einer Studierenden der Agrarwissenschaften der Fachrichtung Nutztierwissenschaften angefertigt (Titel: Eintragswege der Afrikanischen Schweinepest und Bewertung von Biosicherheitsmaßnahmen in Schweinehaltungssystemen mit Blick auf zukünftige Haltungsformen). Der Fokus dieser Arbeit lag dabei auf dem Zusammenhang zwischen Biosicherheitsmaßnahmen und den Eintragswegen unter Berücksichtigung des Strukturwandels, um herauszufinden, welche Eintragswege an Bedeutung für die unterschiedlichen Haltungssysteme gewinnen, jedoch auch an Bedeutung verlieren könnten.

Vorträge und geplante Publikationen

Die Zwischenergebnisse des Projekts wurden auf der Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“ der Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V. anhand eines Posters vorgestellt (siehe Anhang, S. 18). Die Tagung mit dem Schwerpunktthema „Hygiene und Biosicherheit – Eckpfeiler moderner Tierhaltung“ fand am 5. bis 6. Oktober 2023 an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel statt.

Zudem werden die Daten für eine Publikation in einem wissenschaftlichen peer-reviewed Fachjournal aufbereitet, ein solches Manuskript soll im April bei einem entsprechenden Journal eingereicht werden. Der Arbeitstitel lautet „Visualizing anthropogenic transmission pathways of African Swine Fever using fluorescent markers.“.

Göttingen, den 25.03.2024



Prof. Dr. Imke Traulsen

Literatur

Fiedler, A., Rehdorf, J., Hilbers, F., Johrdan, L., Stribl, C., & Benecke, M. (2008). Detection of Semen (Human and Boar) and Saliva on Fabrics by a Very High Powered UV-/ VIS-Light Source. *The Open Forensic Science Journal*, 1, 12-15. <http://dx.doi.org/10.2174/1874402800801010012>.

FluoTechnik. (2022). Kataloge und technischen Leitfäden. <https://www.fluotechnik.de/kataloge-und-technischen-leitfaden-pxl-47.html> (zuletzt 21.04.2023).

Friedrich-Loeffler-Institut. (2021). Afrikanische Schweinepest: Steckbrief. In Friedrich-Loeffler-Institut & Friedrich-Loeffler-Institut (eds.), *Informationen des FLI: Steckbriefe: Vol. engl. Version* (korr. Fassung). Friedrich-Loeffler-Inst. https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00068449 (zuletzt 06.03.2024).

Guinat, C., Gogin, A., Blome, S., Keil, G., Pollin, R., Pfeiffer, D. U., & Dixon, L. (2016). Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *The Veterinary record*, 178(11), 262–267. <https://doi.org/10.1136/vr.103593>.

Kosowska, A., Barasona, J. A., Barroso-Aréval, S., Blondeau, L. L., Cadenas-Fernández, E., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2023). Low transmission risk of African swine fever virus between wild boar infected by an attenuated isolate and susceptible domestic pigs. *Frontiers in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1177246>.

Miranda, G. E., Prado, F. B., Delwing, F., & Daruge, E., Jr (2014). Analysis of the fluorescence of body fluids on different surfaces and times. *Science & justice : journal of the Forensic Science Society*, 54(6), 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.10.002>.

Newsom, R., Pattison, C., Amara, A., & Louca, C. (2022). Detection of dental fomites using topical fluorescein. *British Dental Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41415-022-4403-7>.

Njau, E. P., Machuka, E. M., Cleaveland, S., Shirima, G. M., Kusiluka, L. J., Okoth, E. A., & Pelle, R. (2021). African Swine Fever Virus (ASFV): Biology, Genomics and Genotypes Circulating in Sub-Saharan Africa. *Viruses*, 13(11), 2285. <https://doi.org/10.3390/v13112285>.

Phan, L., Su, Y. M., Weber, R., Fritzen-Pedicini, C., Edomwande, O., Jones, R. M., & CDC Epicenter Prevention Program (2018). Environmental and body contamination from cleaning vomitus in a health care setting: A simulation study. *American journal of infection control*, 46(4), 397–401. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.10.003>.

Scanlon, J. W., & Leikkanen, M. (1973). The use of fluorescein powder for evaluating contamination in a newborn nursery. *The Journal of Pediatrics*, 82(6), 966–971. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(73\)80426-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(73)80426-3).

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.

Su, Y. M., Phan, L., Edomwande, O., Weber, R., Bleasdale, S. C., Brosseau, L. M., Fritzen-Pedicini, C., Sikka, M., & Jones, R. M. (2017). Contact patterns during cleaning of vomitus: A simulation study. *American Journal of Infection Control*, 45 (12), 1312-1317. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.07.005>.

Sueker, M., Stromsodt, K., Gorji, H. T., Vasefi, F., Khan, N., Schmit, T., Varma, R., Mackinnon, N., Sokolov, S., Akhbardeh, A., Liang, B., Qin, J., Chan, D. E., Baek, I., Kim, M. S., &

Tavakolian, K. (2021). Handheld Multispectral Fluorescence Imaging System to Detect and Disinfect Surface Contamination. *Sensors* (Basel, Switzerland), 21(21), 7222. <https://doi.org/10.3390/s21217222>.

TierSeuchInformationsSystem. (2024). Tierseuchenabfrage Afrikanische Schweinepest. https://tsis.fli.de/Reports/Info_SO.aspx?ts=011&guid=03e227c1-278f-48fc-b369-c1c48d4f43ef (zuletzt 06.03.2024).

6. Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG)

Untersuchungen der Eignung von Fluorescein als Marker zur Bewertung möglicher Infektionswege am Beispiel der Afrikanischen Schweinepest.

Lena Kaatz¹, Rafael Hernán Mateus-Vargas¹, Nicole Kemper² und Imke Traulsen³

¹ Department für Nutztierwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen
² Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
³ Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Einleitung

- **Afrikanische Schweinepest** (ASP) ist die relevanteste Schweinekrankheit in Europa, die durch das Afrikanische Schweinepest-Virus (ASPV) ausgelöst wird
- ASP-Eintrag in Betrieb lediglich über **Biosicherheitsmaßnahmen nach der Schweinehaltungshygieneverordnung** zu verhindern
- Simulation einer Erreger-Übertragung in praxisrelevanten Situationen anhand eines **Fluoreszenzfarbstoffs (Fluorescein, Abb. 1)**
- hier betrachtete **Eintragswege: Reifen, Laderklappe und Schuhwerk (Abb. 2)**

Material & Methode

1. Literaturrecherche zur Durchführung von Fluoreszenz-Versuchen
2. Entwicklung eigener Versuchsprotokolle
 - **Annahme: Fluorescein repräsentiert das ASPV** bzw. kontaminierte Matrizen
 - Farbstoff: Fluorescein (Uranin), Firma Roth
 - untersuchte Szenarien werden rechts dargestellt (s. Abb. 2)
 - Dokumentation anhand Foto-Aufnahmen, ausgewertet mit ImageJ™

Ergebnisse

- Erstellung von Versuchsprotokollen
- **erste erfolgreiche Durchführungen von Fluoreszenz-Versuchen in diesem Rahmen**
- Farbstoff konnte in verschiedenen Anwendungen getestet werden
- Farbstoff ist auf wasserabweisenden Oberflächen für etwa 45 Minuten sichtbar
- Farbstoff lässt sich über etwa 6 m über Schuhwerk auf feuchtem Untergrund verteilen

Fazit Fluorescein hat das Potential zur Bewertung von Biosicherheitsmaßnahmen eingesetzt zu werden.



Abb. 1: Zu sehen ist der Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein bei Tageslicht (unten) und das gelblich emittierte Licht des Farbstoffs unter Bestrahlung mit UV-Licht (oben).

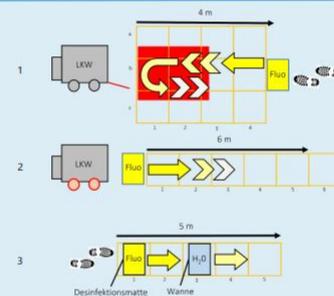


Abb. 2: Schematischer Versuchsaufbau der drei Szenarien mit Fluoreszenzfarbstoff: Reifen (1), Laderampe (2) und Desinfektionsmatte (3); jedes Quadrat entspricht 1m², das gelb markierte Rechteck entspricht dem Gefäß mit Fluoreszenz-Lösung („Fluo“).



Abb. 3: Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein im Versuch des Szenario 2 mit einem Fahrradreifen (links), der über eine trockene und nasse Oberfläche gerollt wurde (Teer, zentrales Bild) und mit einer standardisierten Maßeinheit dokumentiert wurde (rechts).



Kontakt
 Lena Kaatz
 lena.kaatz@uni-goettingen.de



Biographie
 Lena Kaatz ist wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Systeme der Nutztierhaltung. Sie promoviert zum Thema „Modellierung der Afrikanischen Schweinepest – Untersuchung und Simulation des Eintragsrisikos, der Ausbreitung und der Bekämpfung in deutschen Schweinehaltungssystemen“.

Danksagung
 Wir bedanken uns recht herzlich für die finanzielle Unterstützung bei QS Qualität und Sicherheit GmbH (QS-Wissenschaftsfond), den Uelzener Tierversicherungen und Rückversicherer.



5. Oktober 2023, Kiel

www.uni-goettingen.de

[Link zum Poster "Untersuchungen der Eignung von Fluorescein als Marker zur Bewertung möglicher Eintragswege am Beispiel der Afrikanischen Schweinepest."](#)