

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Tenazität und Desinfektion des Virus der Afrikanischen Schweinepest im Waldboden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Franziska Tanneberger
aus Luckau

Leipzig 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle, Fachgebiet Infektions- und Umwelthygiene
bei Nutztieren, Fakultät der Agrarwissenschaften, Universität
Hohenheim

Tag der Verteidigung: 24.05.2022

Jeanne, Uwe, Lea und Lotte

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
2	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	<u>3</u>
2.1	VIRUS DER AFRIKANISCHEN SCHWEINEPEST (ASFV)	<u>3</u>
2.1.1	VIRUS	3
2.1.2	EPIDEMIOLOGIE	3
2.1.3	PATHOGENESE UND SYMPTOMATIK	5
2.1.4	DIAGNOSTIK.....	6
2.1.5	BEKÄMPFUNG	6
2.2	TENAZITÄT VON ASFV	<u>8</u>
2.3	DESINFEKTION.....	<u>9</u>
2.3.1	PERESSIGSÄURE	11
2.3.2	ZITRONENSÄURE	12
2.3.3	KALK.....	13
2.4	BODENBESCHAFFENHEIT	<u>15</u>
2.4.1	HUMUSHORIZONT.....	15
2.4.2	MINERALISCHER OBERBODEN	17
2.5	ASFV IN BÖDEN	<u>17</u>
2.5.1	DESINFEKTION VON BÖDEN	18
3	<u>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</u>	<u>19</u>
3.1	VERÖFFENTLICHUNG 1	19
3.2	VERÖFFENTLICHUNG 2	31
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>42</u>
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>50</u>
6	<u>SUMMARY</u>	<u>52</u>
7	<u>REFERENZEN.....</u>	<u>54</u>
8	<u>ANHANG</u>	<u>64</u>

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A-Horizont	oberer Mineralboden-Horizont
ASP	Afrikanische Schweinepest
ASFV	Virus der Afrikanischen Schweinepest
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BRD	Bundesrepublik Deutschland
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPA	Environmental Protection Agency
EU	Europäische Union
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
HAD	Hämadsorptionstest
Kbp	Kilobasenpaare
km	Kilometer
l	Liter
L-Horizont	Laubdeckschicht-Horizont
m	Meter
mm	Millimeter
MS	mineral soil
MVA	Modified Vaccinia Ankara
O-Horizont	Humus-Horizont
OIE	World Organization of Animal Health
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia Hydrogenii
RPA	Recombinase Polymerase Amplification
TCID ₅₀	Tissue Culture Infection Dose 50
TS	top soil
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
UV	ultraviolettes Licht

1 Einleitung

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) ist eine hochkontagiöse Tierseuche, welche ausschließlich Schweine (*Suidae*) befällt. Auslösender Erreger ist das Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASFV), ein behülltes DNA-Virus, das zur Familie der *Asfarviridae* gezählt wird. Erstmals nachgewiesen wurde das Virus im Jahr 1921 in Kenia, von wo aus es sich über zahlreiche afrikanische und asiatische Länder nach Europa ausbreitete. Inzwischen ist eine Vielzahl der Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU) von der Seuche betroffen, seit September 2020 auch erstmals Deutschland. Als Quelle für die in Sachsen und Brandenburg aufgetretenen Infektionen bei Wild- und Hausschweinen im grenznahen östlichen Teil des Landes gilt hier das Ausbruchsgeschehen in Polen. Unklar ist jedoch, wie es im November 2021 zur Infektion von Haus- und nur wenig später auch Wildschweinen in Mecklenburg-Vorpommern nahe Niedersachsen kommen konnte. Dieses Szenario beweist die komplexe Verbreitungsdynamik des Virus sowie akute Bedrohung für die nationalen Hausschweinbestände und die dringende Notwendigkeit sicherer Bekämpfungsmaßnahmen. Nur in wenigen Ländern ist bisher unter großem logistischem Aufwand eine Eliminierung der ASP in den Wildschweinpopulationen gelungen; hierbei gelten vor allem Tschechien und Belgien als Paradebeispiele in der radikalen ASP-Bekämpfung.

Im europäischen Raum bilden Wildschweine (*Sus scrofa*) das anhaltende Reservoir für das Virus und verbreiten es latent weiter, da die Tiere auch lediglich subklinisch infiziert sein können, ohne direkt zu verenden. Diese Tatsache legt nahe, dass das Virus ohne konsequente Bekämpfung in den Wildschweinbeständen langfristig endemisch zu werden scheint. Zusätzlich zeigen Wildschweine jedoch ebenso eine Empfänglichkeit gegenüber virulenten Stämmen; infizierte Tiere sterben in aller Regel innerhalb weniger Tage. Die resultierenden Kadaver gelten je nach Witterungslage für Tage bis Wochen als hochinfektiös und auch der Erdboden mit direktem Kadaverkontakt stellt somit eine erhebliche Infektionsquelle dar.

Einer Desinfektion bzw. sicheren Entfernung des betroffenen Waldbodens in der unmittelbaren Umgebung eines Wildschweinkadavers kommt daher in Krisenplänen eine zentrale Bedeutung zu. Die bisherige Empfehlung der Desinfektionsrichtlinie sah unter anderem ein Abtragen und unschädliches Beseitigen bzw. Lagern des betroffenen Erdreiches vor. Diese Methode birgt jedoch das Risiko der Erregerverschleppung und stellt einen erheblichen logistischen Aufwand dar.

Obwohl die Desinfektion eine der Hauptmaßnahmen der Tierseuchenbekämpfung ist und die genaue Durchführung der Oberflächendesinfektion befestigter Böden durch

Vorgaben in der Desinfektionsrichtlinie des Bundes geregelt ist, liegen für die direkte Desinfektion von unbefestigten Erdböden nur wenige Untersuchungsergebnisse vor. Ziel der hier durchgeführten Studie war es, die Stabilität von ASFV in Erdböden sowie die Effektivität verschiedener Desinfektionsmittel und -konzentrationen in Bezug auf die Inaktivierung von ASFV unter hoher organischer Belastung zu untersuchen. Da Erdböden in ihrem Aufbau sehr heterogen sind, wurden alle Versuche in Kombination mit sechs repräsentativen sächsischen Waldböden durchgeführt.

Für die Experimente wurden die in der Desinfektionsrichtlinie enthaltenen Desinfektionsmittel Peressigsäure, Zitronensäure und Kalk ausgewählt sowie die notwendige Ausbringungsmenge der Mittel geprüft. Die Versuche im Labor wurden in erster Instanz anhand eines behüllten, alternativen Virus, Modified Vaccinia Ankara (MVA), einem Pockenvirus, durchgeführt. Dieses Virus stellt ein offizielles Testvirus für Desinfektionsmittelprüfung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) für behüllte DNA-Viren dar, sodass die hierbei erhobenen Ergebnisse direkt auf ASFV übertragen werden können. Da die Arbeit mit ASFV laut Biostoff-Verordnung (BioStoffV) ausschließlich auf Hochsicherheitseinrichtungen beschränkt ist, wurden die aussagekräftigsten Parameter bzw. Desinfektionskonzentrationen der einzelnen Mittel im Anschluss am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) mit ASFV validiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASFV)

2.1.1 Virus

ASFV ist ein großes komplexes und doppelt behülltes DNA-Virus (175-215 nm), das den einzigen Vertreter der Familie der Asfarviridae (**African Swine Fever And Related Virus**) darstellt (KLEIBOEKER and SCOLES 2001). Das Genom besteht aus doppelsträngiger DNA mit einer Länge von 170-190 Kbp (YANEZ et al. 1995, CHAPMAN et al. 2008, DE VILLIERS et al. 2010, DIXON et al. 2013) und kodiert mehr als 150 Proteine (WANG et al. 2021).

2.1.2 Epidemiologie

Das Virus ist der Erreger der Afrikanischen Schweinepest, einer anzeigepflichtigen, kontagiösen Tierseuche, die ausschließlich Schweine (Haus-, Wildschweine in Europa und Warzen- und Buschschweine im afrikanischen Raum) befällt. In Deutschland ist die ASP nach dem Tiergesundheitsgesetz anzeigepflichtig und gilt weiterhin nach Verordnung (EU) 2016/429 des europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 als eine Kategorie A-Seuche und muss folglich in allen Mitgliedsstaaten bekämpft werden.

Der Ursprung der Krankheit befindet sich in Afrika; die genannten wilden afrikanischen Schweinearten erkranken meist subklinisch und übertragen das Virus aufgrund zu geringer Bluttitel in aller Regel nicht untereinander oder auf Hausschweine, sondern stellen lediglich ein natürliches Reservoir (OURA et al. 1998a) zur Übertragung durch die Zeckengattung *Ornithodoros* dar (WILKINSON 1984, COSTARD et al. 2013). Die Zecken werden vor allem durch Blutmahlzeiten an den subklinisch infizierten wilden Schweinearten (besonders junge Warzenschweine (GAUDREAULT et al. 2020)) zum Vektor und verbreiten das Virus bei jeder erneuten Nahrungsaufnahme weiter. Entsprechend gilt *Ornithodoros* in Afrika als Hauptüberträger (PINI and HURTER 1975); diese Tatsache macht ASFV zum bisher einzigen bekannten DNA-Arbovirus (**Arthropode Borne Virus**).

Im europäischen und asiatischen Raum spielt die Übertragung durch Zecken keine Rolle; hier wird insbesondere der Kontakt zwischen Wild- und Hausschweinen (GOGIN et al. 2013) bzw. die Verbringung kontaminierten Materials als Infektionsquelle angesehen. Die Übertragung findet hier sowohl von Tier zu Tier (über Gewebe, Blut, Sekrete und Exkrete) oder über kontaminierte Schweinefleischprodukte (MEBUS et al. 1993, PETRINI et al. 2019) als auch über diverse unbelebte Vektoren wie kontaminierte Stallräume (OLESEN et al. 2018) statt.

Seit ihrem ersten Auftreten in Ostafrika im Jahr 1921 (MONTGOMERY 1921) hat sich die Tierseuche zeitlich intermittierend auch nach Europa verbreitet. Ein erstmaliger Ausbruch der Schweineseuche erfolgte auf dem europäischen Kontinent in Portugal, im Jahr 1957 (BOINAS et al. 2011). Über die folgenden 30 Jahre brach die Tierseuche immer wieder temporär in verschiedenen europäischen Staaten wie zum Beispiel Spanien und Italien aus, bis ASFV in einem neuen Ausbruch im Jahr 2007 von Russland bzw. Südostasien ausgehend über Georgien, Weißrussland in die EU gelangte und das Baltikum, Polen, Rumänien, Tschechien und Belgien erreichte. Dieses Ausbruchsgeschehen setzt sich bis heute fort, sodass es 2020 zu einer Ausbreitung auch in die deutschen Wildschweinbestände gekommen ist (SAUTER-LOUIS et al. 2020). Seit Juli 2021 sind auch die ersten nationalen Hausschweinbestände betroffen (COMMISSION 2021). Ebenso stellen China und Russland weiterhin große beständige Infektionsherde im außereuropäischen Raum dar. Insbesondere das russische Ausbruchsgeschehen spielt bei den zahlreichen Ausbrüchen in den osteuropäischen und baltischen Staaten eine zentrale Rolle. Obwohl viele europäische Länder betroffen sind (Abb. 1), haben lediglich Tschechien und Belgien ihre Haus- und Wildschweinbestände durch rigide Bekämpfungsmaßnahmen nach einem Ausbruch von ASP befreien können (ŠATRÁN 2019, CLAEYS and HEYMANS 2020). Im Gegensatz hierzu gilt Sardinien seit 1978 als das bisher einzige europäische Gebiet, in dem die ASP inzwischen als endemisch angesehen wird (FIORI et al. 2021).

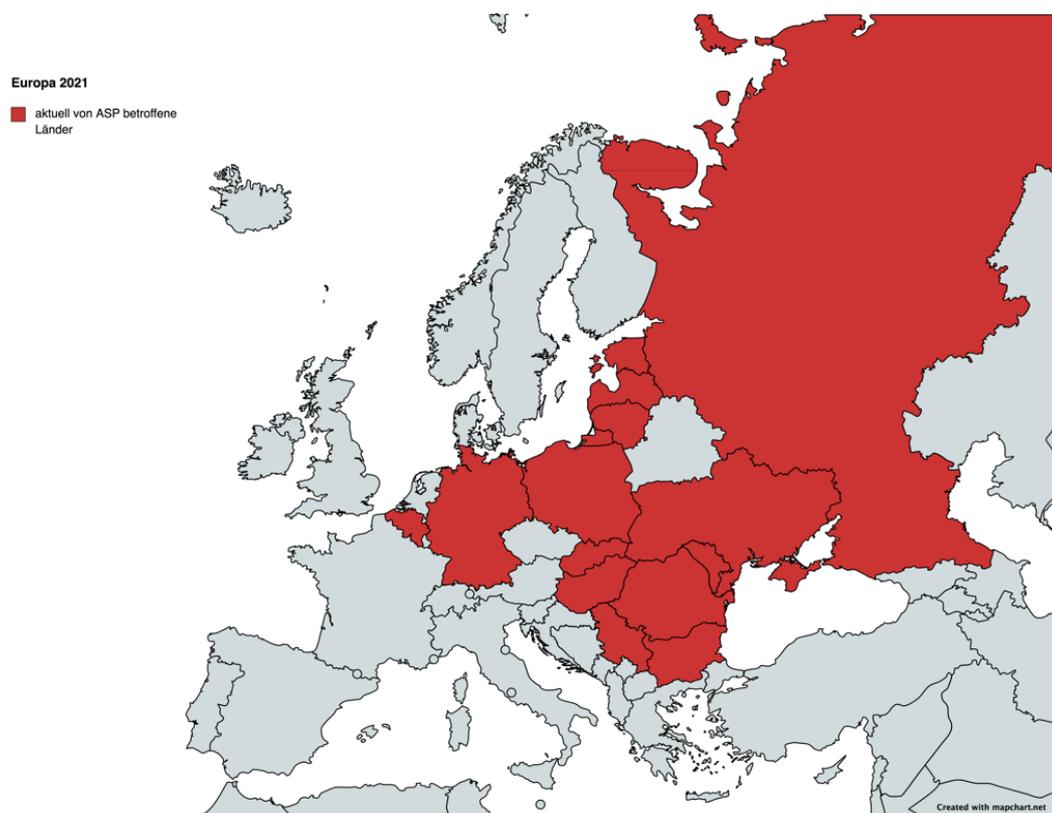


Abb. 1 aktuell von ASP betroffene Staaten Europas (Stand 29.10.2021, nach FLI (2021a))

2.1.3 Pathogenese und Symptomatik

Die Infektion mit dem Virus erfolgt nach oraler Aufnahme in aller Regel über die Tonsillen oder die Rachenschleimhaut und die Lymphknoten der Rachenregion (SÁNCHEZ-VIZCAÍNO 2009). Nach den anfänglich dort stattfindenden Replikationsvorgängen sowie sich anschließender Virämie erfolgt die hauptsächliche Virusreplikation in den Zellen des mononukleär-phagozytären Systems (GOMEZ-VILLAMANDOS 2003).

Üblicherweise beträgt die Inkubationszeit zwischen vier und neunzehn Tage; dies hängt jedoch stark von der individuellen Virulenz des entsprechenden Isolats ab. Somit kann die Krankheit einen perakuten, akuten, subakuten oder chronischen Verlauf nehmen (SANCHEZ-VIZCAINO et al. 2015, (OIE 2018). Bei der akuten Form kann die Inkubationszeit jedoch auf drei bis vier Tage verkürzt sein. Selten kommt es auch zu einem vollständig symptomfreien Verlauf. Zusätzlich können genesene Tiere weiterhin persistent infiziert sein (Virusreservoir v.a. in Milz und Lymphknoten).

Äußerliche Kardinalsymptome der hochvirulenten Virusvarianten und der entsprechend perakuten bis akuten Form sind neben plötzlichem Tod (vor allem perakute Form) auch Fieber über 40°C, sowie daraus folgende Fressunlust und Gewichtsabnahme inklusive weiterer gastrointestinaler Symptome, Rötung der Haut (Ohren, Abdomen, untere Extremitäten) und Zyanosen (SANCHEZ-VIZCAINO et al. 2015, (OIE 2018) zu beobachten. Der Tod tritt hier in einer Zeitspanne von sechs bis zwanzig Tagen ein (OIE 2018). Auch bisweilen blutiger Durchfall und plötzliche Aborte während jeglicher Trächtigkeitsphase können ein Hinweis auf eine Erkrankung sein (SCHLAFER and MEBUS 1987).

Weitere Symptome des akuten Verlaufs treten erst bei genauer Organbetrachtung während der Sektion betroffener Tiere in Erscheinung. Hierbei sind insbesondere petechiale Einblutungen in der Nierenrinde (BLOME et al. 2013), eine deutlich verzögerte Blutgerinnung sowie hämorrhagisch vergrößerte Lymphknoten auffällig (SANCHEZ-VIZCAINO et al. 2015). Auch eine ödematisierte Gallenblasenregion mit Hämorrhagien ist bisweilen anzutreffen (KLEIBOEKER 2002). Ebenso können Splenomegalie, hämorrhagische Gastritiden (GABRIEL et al. 2011) und Aszites (SANCHEZ-VIZCAINO et al. 2015) befundet werden. Weiterhin zeigen Schweine mit einer ASFV-Infektion häufig eine akute Lymphopenie. Als Ursache hierfür wird eine erhöhte, zytokinvermittelte Apoptose (OURA et al. 1998b, SALGUERO et al. 2005) der Zellen des lymphozytären Systems vermutet (KARALOVA et al. 2012).

Die subakuten Verläufe der weniger virulenten Stämme sind deutlich unspezifischer und zeichnen sich durch Fressunlust und Gewichtsverlust, rekurrendes Fieber (SANCHEZ-VIZCAINO et al. 2015), milde respiratorische Symptome bis Pneumonien

sowie eine geringere Mortalitätsrate von 30 bis 70% aus (KLEIBOEKER 2002). Die innerlichen Symptome gleichen denen der perakuten bis akuten Verläufe, nur in milderer Ausprägung. Die beim Hausschwein selten auftretenden chronischen Krankheitsverläufe werden ebenso durch weniger virulente Stämme ausgelöst und zeigen eine deutlich unspezifischere Klinik. Hierzu zählen vor allem arthritische Veränderungen und Hautnekrosen (SANCHEZ-VIZCAINO et al. 2015).

Von der reinen Symptomatik her ist die ASP nicht von der Klassischen Schweinepest (KSP) zu unterscheiden (OIE 2019). Aufgrund der recht unspezifischen Symptomatik sind auch die Aujeszky'sche Krankheit (AK), das Porzine Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS), das Porzine Reproduktive und Respiratorische Syndrom (PRRS), sowie Rotlauf mögliche Differentialdiagnosen. Weiterhin muss auch die Infektion mit *Salmonella enterica subsp. cholerasuis* in Betracht gezogen werden. Das Fehlen pathognomonischer klinischer Befunde macht den Erregernachweis zur sicheren Seuchenfeststellung notwendig.

2.1.4 Diagnostik

Zur Diagnostik eignen sich sowohl direkte Erreger-Nachweise durch Virusisolierung und anschließende Immunfluoreszenz oder Hämadsorptionstest (HAD) bzw. der Genomnachweis durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder die erst kürzlich publizierte Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) (CERUTI et al. 2021). Weiterhin eignen sich auch Antikörper-Nachweise wie ELISA, indirekter Immunoperoxidasetest oder indirekte Immunfluoreszenz (OIE 2019), welche jedoch nicht gebräuchlich sind. Geeignetes Probenmaterial liefern laut amtlicher Methodensammlung des FLI EDTA-Blut, blutgetränktes Tupfermaterial oder Serum wie auch Organproben aus Milz, Lymphknoten, Nieren, Lunge oder Tonsillen und Röhrenknochen (FLI 2021b). Die erste Feststellung erfolgt im jeweils zuständigen Landesuntersuchungsamt; die finale Verifikation der Diagnose muss zwingend am nationalen Referenzlabor des FLI erfolgen. Nach Sicherung der Diagnose müssen gezielte Bekämpfungsmaßnahmen eingeleitet werden.

2.1.5 Bekämpfung

Als präventive Maßnahme zum Schutz gegen die ASP eignet sich lediglich ein striktes Hygieneregime (COSTARD et al. 2009), da es trotz umfassender internationaler Forschungen zum jetzigen Zeitpunkt keine wirksame Impfung gibt. In der Schweinehaltungshygieneverordnung (ANON. 1999) sind einzelne seuchenprophylaktische Maßnahmen, wie die verpflichtende Betreuung von Hausschweinbeständen durch einen Tierarzt, auf nationaler Ebene geregelt. Die Empfehlungen des FLI zur Desinfektion von Tierseuchen (FLI 2019) enthalten ebenso Vorgaben für den prophylaktischen Desinfektionsvorgang wie auch für den

Tierseuchenfall. Diese vorsorglichen Maßnahmen erschweren die potentielle Einschleppung der ASP in Schweinebestände. Sollte es trotz aller Vorsichtsmaßnahmen zu einem ASP-Ausbruch kommen, erfolgt die Bekämpfung der ASP weltweit nahezu identisch.

Aufgrund der hohen Kontagiösität und Stabilität sind nach Feststellung der Afrikanischen Schweinepest rigide Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen notwendig (ANON. 1988). Die Kontrolle der jeweiligen wildlebenden Schweinepopulationen, allgemeine präventive Hygienemaßnahmen wie Sicherung der Hausschweinbestände vor Wildschweinkontakt, Reinigung und Desinfektion von Stallanlagen, Gegenständen und Arbeitskleidung sowie die sichere Entsorgung von Kadavern, Gülle und Küchenabfällen bilden hier die Grundlage.

Im europäischen Raum fallen die genannten Bekämpfungsmaßnahmen unter die Durchführungsverordnung (EU) 2021/605 (EU 2021). Die „Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest“ (Schweinepest-Verordnung) (ANON. 1988) stellt den genauen gesetzlichen Rahmen zur Bekämpfung des Ausbruchsgeschehens auf nationaler Ebene dar.

Im Fall eines Ausbruchsgeschehens bei Schweinen (Haus- oder Wildschweinen) erfolgt nach VO (EU) 2021/605 die Einrichtung von Restriktionszonen, d.h. Restriktionszone I (kein Nachweis von ASP bei Wild- oder Hausschweinen, ehemals Pufferzone), die Restriktionszone II (Nachweis von ASP bei Wildschweinen bzw. ehemals gefährdetes Gebiet) und Restriktionszone III (Nachweis von ASP in Hausschweinbeständen mit oder ohne Ausbruch bei Wildschweinen) (EU 2021). Insgesamt muss vom Bekämpfungsvorgehen her zwischen einem Ausbruch bei Hausschweinen und einem Ausbruch bei Wildschweinen unterschieden werden.

Die Bekämpfung bei Ausbrüchen in Hausschweinbeständen erfolgt durch Einstufungen in die Sperrzonen III (infizierte Hausschweinbestände mit oder ohne Ausbruch bei Wildschweinen) und I (kein Ausbruch von ASP bei Wild- oder Hausschweinen, ehemals Pufferzone) nach der neuen EU-Durchführungsverordnung ((EU) 2021). Sie ersetzen die bisherige Einstufung in Kernzone/Sperrbezirk (3-5 km innerhalb der gefährdeten Zone um den Ausbruchsbetrieb), gefährdetes Gebiet (in der Regel 10-15 km um den betroffenen Betrieb) und Pufferzone (doppelter Radius des gefährdeten Gebiets) (ANON. 1988). Ein an Restriktionszone III angrenzendes Gebiet ohne nachweislich infizierte Haus- oder Wildschweine gilt nunmehr immer als Restriktionszone I. Sind in diesem angrenzenden Bezirk lediglich infizierte Wildschweine vorhanden, erfolgt die Einstufung als Restriktionszone II.

Des Weiteren erfolgen die Tötung und unschädliche Beseitigung aller Schweine eines nachweislich infizierten Bestands sowie auch bei Verdacht. Eine Verbringung von Schweinen innerhalb bzw. aus der Restriktionszone III heraus ist untersagt, ebenso

wie die Behandlung erkrankter Tiere (ANON. 1988, EU 2021). Während des Ausbruchsgeschehens wird eine Dreifachdesinfektion in Form von laufender, vorläufiger und amtlich kontrollierter Schlussdesinfektion durchgeführt, welche alle ausschließlich mit DVG-gelisteten Mitteln durchzuführen sind. Aufgrund der in aller Regel lokalen Begrenzung von Infektionsgeschehen in Hausschweinbeständen, sind diese Ausbrüche meist schnell und effektiv einzudämmen.

Im Fall eines reinen ASP-Ausbruchs bei Wildschweinen erfolgt die Einstufung als Sperrzone II nach der neuen EU-Durchführungsverordnung (EU 2021). Sie ersetzt die bisher gängige Einstufung als gefährdeter Bezirk (ANON. 1988). Weiterhin gelten die ausschließlichen und umfassenden Desinfektionsmaßnahmen von Kadaverfundorten und dort verwendeten Arbeitsmaterialien mit DVG-gelisteten Mitteln. Diese Maßnahmen werden von den zuständigen Veterinärämtern angeordnet. Insbesondere die bereits erwähnte Entsorgung der infektiösen Kadaver sowie der Untergrunddesinfektion kommt hierbei eine besondere Gewichtung zu, da auch die indirekte Erregerverbreitung über Aasfresser nicht zu unterschätzen ist.

Wegen der genannten Punkte kann sich die ASP innerhalb von Wildschweinpopulationen rasant verbreiten und im schlimmsten Fall endemisch werden. Es muss somit eine intensive Reduktion der Wildschweindichte durch die zuständigen Jäger innerhalb des Sperrbezirks II bzw. III (bei zusätzlichen Wildschweininfektionen) sowie die extensive Suche von Fallwild erfolgen. Zusätzlich sind Schweinehalter innerhalb der Sperrzone II verpflichtet, präventive Desinfektions- und Sicherungsmaßnahmen in ihren Beständen vorzunehmen. Eine Verbringung von Hausschweinen aus einer Sperrzone II ist unter Ausschluss einer Infektion durch amtlich überwachte Testungen jedoch möglich (EU 2021).

Am aktuellen Beispiel des sächsischen bzw. brandenburgischen Ausbruchsgeschehens bei Wildschweinen zeigt sich allerdings eine erschwerte Eindämmbarkeit in die Restriktionszonen, da ein permanenter Infektionsdruck aus Polen vorliegt. Aufgrund des großen Bewegungsradius von Wildschweinhorden sowie der hohen Virusstabilität ist ein Infektionsgeschehen somit nur schwer kontrollierbar. Ein einmal festgestellter Ausbruch ist daher so frühzeitig wie möglich einzudämmen.

2.2 Tenazität von ASFV

Generell ist das Virus äußerst umweltstabil, insbesondere bei niedrigen Umgebungstemperaturen. Auch ist bekannt, dass unzureichend erhitzte Produkte aus dem Fleisch ASFV-infizierter Tiere zu einer Verbreitung des Virus beitragen können. Hitzebeständig ist das Virus bei 56°C für mehr als eine Stunde (PLOWRIGHT 1967), was unzureichend erhitztes Fleisch und Wursterzeugnisse von infizierten Schweinen bis zu mehreren Monaten zu einer erheblichen Infektionsquelle macht. Hier hält sich

das Virus beispielsweise in Schinken bis zu 6 Monate und in gekühltem Fleisch bis zu 15 Wochen (MCKERCHER 1978, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO 2009).

Die Verfütterung von kontaminierten, unerhitzten Schweinefleischprodukten gilt historisch betrachtet als einer der hauptsächlichen Übertragungswege der ASP über Landesgrenzen hinweg (SANCHEZ-VIZCAINO et al. 2012). Weiterhin zeigt sich auch in ungeronnenem Blut eine Virustenazität von 18 Monaten bei Raumtemperatur sowie bei 4°C von bis zu 6 Jahren (EFSA 2014a) und in geronnenem bzw. getrocknetem Blut von Monaten bis Jahre (KOVALENKO 1965). Ebenso kann der Virusgehalt in Blut besonders hoch sein. Auch in Kot bleibt die Infektiösität über 8 Tage erhalten (DAVIES et al. 2017); andere Quellen berichten von einer Tenazität in Fäkalien von bis zu 160 Tage (KOVALENKO 1965). Des Weiteren weist der Erreger eine große Stabilität gegenüber pH-Veränderungen auf. Eine Deaktivierung erfolgt erst bei pH-Werten <4 bzw. >13 (PLOWRIGHT 1967), wobei ein erhöhter Proteingehalt in der Virusumgebung auch hier die Tenazität noch deutlich erhöhen kann. Diese hohe Umweltstabilität ist ungewöhnlich für ein behülltes Virus und macht eine sichere Desinfektion zwar herausfordernd, aber umso notwendiger.

Tabelle 1 Einflussfaktoren auf die Stabilität von ASFV

Faktor	stabilitätsfördernd	stabilitätsmindernd
Temperatur	geringe Umgebungstemperaturen	hohe Umgebungstemperaturen
Feuchtigkeit	hohe Feuchtigkeit	geringe Feuchtigkeit
pH	pH zwischen 4 und 13 (v.a. im neutralen pH-Bereich)	<4 bzw. >13
UV-Licht	Dunkelheit	hoher UV-Anteil
organische Bestandteile	hoher Proteingehalt	geringer organischer Anteil

2.3 Desinfektion

Die Desinfektion umfasst den zentralen Teil zur Bekämpfung eines Tierseuchenausbruchs. Die Empfehlungen des FLI zur Desinfektion von Tierseuchen stellen die Neuauflage der Desinfektionsrichtlinie dar, welche den Rahmenplan für die prophylaktischen Desinfektionsvorgänge sowie auch beim Vorliegen einer Tierseuchensituation liefern.

Zu den dort geregelten Maßnahmen zählen neben der Desinfektion auch die Bekämpfung von Schädigern und anderen Schadorganismen zur Unterbrechung der Verbreitung des Tierseuchenerregers. Diese Sachverhalte der Desinfektionsvorgänge wurden 1993 in der ersten Desinfektionsrichtlinie verankert. Sie deckt Desinfektionsvorgänge im Allgemeinen als auch im Speziellen für die einzelnen Tierseuchen ab. Die Richtlinie bietet im Gegensatz zu einer Rechtsverordnung lediglich einen Handlungsrahmen für die zuständigen Ämter, um die jeweiligen

Bekämpfungsverordnungen umzusetzen. Überarbeitungen und Anpassungen erfolgten 2007 und 2020; letztere in Form der Empfehlungen des FLI zur Desinfektion von Tierseuchen (FLI 2019). Die Neuerung der Richtlinie erfolgte vor allem zur Ergänzung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse in Bezug auf Desinfektionsverfahren, Wirkungsweisen, Prüfmethode sowie neuartige technische Anlagen (FLI 2020a).

Laut Richtlinie wird bei Ausbruch einer Tierseuche die laufende sowie vorläufige Desinfektion durchgeführt. Ein Ausbruchsgeschehen endet offiziell durch die vom zuständigen Amtstierarzt angeordnete und kontrollierte Schlussdesinfektion. Die jeweiligen wirksamen Wirkstoffklassen sind den Empfehlungen des FLI zur Desinfektion von Tierseuchen zu entnehmen; hier liegt je nach Begründung ein gewisser Spielraum für die Anwendung verschiedener Wirkstoffklassen vor. Aus diesen Wirkstoffklassen muss anschließend zur tatsächlichen Desinfektion entweder die Reinform des jeweiligen Wirkstoffs oder eines der jeweiligen ausschließlich DVG-gelisteten Handelspräparate verwendet werden. Ebenso werden Mindestwerte zur jeweils auszubringenden Desinfektionsmittelmenge je Quadratmeter vorgegeben (FLI 2019).

Da die Desinfektion neben der Reinigung einen der Grundpfeiler bei der Prävention sowie Bekämpfung von Tierseuchen darstellt, legte der 1970 durch die DVG gegründete Ausschuss zur Desinfektion in der Veterinärmedizin im Jahr 1974 erstmalig Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin vor. Seither erfolgen ständige Neuerungen sowie Anpassungen der Prüfstandards nach dem neusten Forschungsstand zur Sicherung der effektiven Desinfektionspraxis in Tierhaltung, im Lebensmittelbereich sowie der Tierarztpraxis. Hier erfolgt die Testung von Desinfektionsmitteln in Bezug auf ihre bakterizide, viruzide, fungizide, sowie später auch auf ihre antiparasitäre Wirkung (DVG 2000). Eine zentrale Rolle nimmt hierbei die Desinfektion von Oberflächen ein; die Prüfmethode umfassen neben diversen Vorprüfungen Suspensions- sowie Keimträgertests.

Zur Desinfektion ASFV-kontaminierter unbefestigter Böden sehen die Empfehlungen des FLI zur Desinfektion von Tierseuchen eine Überschichtung des betroffenen Erdreichs mit Branntkalk, Kalkmilch oder Löschkalk vor. Letzteres ist die bevorzugte Behandlung von Wildschweinkadaverplätzen (FLI 2020b). Weiterhin ist je nach Ermessen des zuständigen Veterinäramtes ein Abtragen des Bodenmaterials von mindestens 10 cm Tiefe sowie eine anschließende, mindestens viermonatige sichere Lagerung vorzunehmen (FLI 2020c). Zugelassene Wirkstoffe sind hierbei der aktuellen Desinfektionsmittelliste der DVG zu entnehmen. Da hier zwar hochpotente aber gleichzeitig auch umwelttoxische Desinfektionsmittel gelistet sind, sollte sich die

Auswahl zur Desinfektion von Erdböden auf ökologisch verträgliche Mittel beschränken (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 gegen ASFV wirksame Desinfektionsmittel nach FLI (2020d)

Wirkstoffkl.	Umweltverträgl.	Matrix	Konz.	Quellen
Organische Säuren	+	Oberflächen	1-2%	(EPA 1992, FAUSER-LEIENSETTER 2000, KRUG et al. 2012)
Peressigsäure	+	Oberflächen /Flüssigmist	2%	(FAUSER-LEIENSETTER 2000, EFSA 2014b)
Formaldehyd	+/-	Oberflächen /Flüssigmist	0,4%/1,1 %	(FAUSER-LEIENSETTER 2000, ANON. 2009)
Natrium-dodecylsulfat	-	Oberflächen /Flüssigmist	3%	(FAUSER-LEIENSETTER 2000, ANON. 2021a)
Glutaraldehyd	-	Oberflächen /Flüssigmist	1%	(FAUSER-LEIENSETTER 2000, ANON. 2021b)
Natriumhydroxid	+/-	Oberflächen /Flüssigmist	0,5%/0,5%-4%	(TURNER and WILLIAMS 1999, FAUSER-LEIENSETTER 2000, ANON. 2021c)
Calciumhydroxid	+	Flüssigmist	0,5-1%	(TURNER and WILLIAMS 1999, ANON. 2016a)
Calciumoxid	+	Festmist	Mistpackung	(BERGDORF 1989) in (HAAS 1995, ANON. 2012)
Hypochlorit	-	Oberflächen	0,0075-0,03%	(SHIRAI et al. 2000, ANON. 2018)
Quartäre Ammoniumverbindungen	-	Oberflächen	0,003%	(SHIRAI et al. 2000, ANON. 2014)

2.3.1 Peressigsäure

Der Wirkstoff der Peressigsäure (auch: Peroxiessigsäure) ist der Gruppe der Peroxide zugehörig. Der Wirkmechanismus beruht auf dem Oxidationsprozess organischer sowie anorganischer Verbindungen (SPRÖSSIG 1989). Generell kann Peressigsäure als ein chemisches Gleichgewicht aus Wasser, Wasserstoffperoxid, Peressig- und Essigsäure verstanden werden (JENTSCH 1978). Aufgrund dieser Komponenten gilt die Säure als äußerst umweltfreundliches Desinfektionsmittel. In Reinform wird sie als farblose Flüssigkeit mit stechendem Geruch und einem optimalen Wirkungsbereich von pH 2,5 bis etwa 4 beschrieben. Ein weiteres Merkmal ist die erhöhte Explosionsgefahr von Konzentrationen ab 50% und einer Temperatur ab 70°C (TICHÁČEK 1978). Lösungen mit einer Konzentration von unter 10% weisen keine

erhöhte Explosionsgefahr mehr auf, jedoch eine zusätzlich herabgesetzte Haltbarkeit im Vergleich zur Reinform. Generell wird eine Lagerung bei 4°C empfohlen, um einem verfrühten Abbau des Peroxids vorzubeugen (TICHÁCEK 1978). Arbeitslösungen sind generell täglich frisch anzusetzen. Da Peressigsäure unter bestimmten Bedingungen auch in sehr geringen Arbeitskonzentrationen ab 0,001% als hochwirksam beschrieben wird, gilt sie als sehr kostengünstiges Desinfektionsmittel (SPRÖSSIG 1979). Selbst in Flüssigmist zeigt Peressigsäure eine sehr gute Wirksamkeit gegen das Virus der Afrikanischen Schweinepest (FAUSER-LEIENSETTER 2000).

Das Wirkungsspektrum umfasst Bakterien, Viren, Sporen sowie Pilze. Weiterhin zeigt Peressigsäure nur einen sehr geringen Temperaturfehler, was sie auch bei niedrigen Umgebungstemperaturen zu einem effizienten Desinfektionsmittel macht. Insbesondere in Verbindung mit hoher Eiweißkontamination in der Umgebung, vor allem in Form von Blut (SPRÖSSIG 1989), wird allerdings ein Wirkungsverlust beschrieben. Dieser kann jedoch mit einer Konzentrationserhöhung in der Gebrauchslösung ausgeglichen werden (BRITZIUS 1981).

2.3.2 Zitronensäure

Zitronensäure kann der Klasse der organischen Säuren zugeordnet werden und weist einen optimalen Wirkungsbereich im Bereich von pH 2 bis 3 auf (WALLHÄUSER 1988). Als ihre wirksame Komponente gilt die Carboxylgruppe (COOH- Gruppe). Die vorliegende Form der Zitronensäure in Bezug auf das Gleichgewicht des Dissoziationsgrades in wässriger Lösung ist stark abhängig vom pH-Wert der Umgebung. Die maximale desinfizierende Wirkung tritt bei niedrigen pH-Werten ein, da die Säure aufgrund ihrer hierbei vorliegenden undissoziierten Form problemlos die Plasmamembran der Organismen durchdringen kann (FLI 2020e). Hier entfaltet sie, wie alle organischen Säuren, ihre Wirkungsweise durch Proteindenaturierung und Zersetzung der Nukleinsäuren bzw. genereller pH-Absenkung (MARIS 1995). Generell kann in der Wirkung zwischen dem reinen pH-absenkenden Effekt und den Effekten durch den nicht-dissoziierten Anteil der organischen Säure unterschieden werden. Dieser wirksame undissoziierte Anteil verringert sich jedoch bei steigendem pH-Wert (WALLHÄUSER 1988).

Das desinfizierende Wirkungsspektrum der Zitronensäure deckt Bakterien und vor allem behüllte Viren ab, wobei organische Verunreinigungen die Wirksamkeit erheblich reduzieren (BÖHM 1986, MÜLLER 2004). Diese Tatsache, sowie der bekannte Temperaturfehler unter 10°C, kann durch Erhöhung der Konzentration in der Gebrauchslösung ausgeglichen werden (FLI 2020e). Dies zeigt sich auch am Beispiel der ASP: im Konzentrationsbereich von 1% bis 7,5% zeigt Zitronensäure eine gute bis sehr gute Wirksamkeit, welche im Beisein von Blut oder Kot jedoch abnimmt (KRUG et al. 2018, CARLSON et al. 2020). Eine weitere Studie beweist die gute Wirksamkeit

von 2% Zitronensäure gegen ASFV auf porösen Untergrundflächen (KRUG et al. 2012).

2.3.3 Kalk

Unter dem Begriff Kalk werden verschiedene Stoffe zusammengefasst, welche aufgrund ihrer pH-erhöhenden Wirkung jedoch alle zu den alkalischen Substanzen gezählt werden können. Hierbei erfolgt eine längerfristige pH-Erhöhung auf >12 , in welchem die meisten Mikroorganismen, wie auch ASFV, abgetötet werden. Bei dieser Wirkstoffklasse werden die Hydroxylgruppen als für die Desinfektion wirksamer Bestandteil betrachtet.

Kalkformulierungen werden vor allem im Bereich der Tierhaltung zur Desinfektion von Stall- und Teichanlagen (BERG 1973, FLI 2020b) sowie der Desinfektion von Mist verwendet (KOCH M.A. 1984, SCHMITZ 2020). Weiterhin werden Kalkanstriche als Hygienemaßnahme für Stallwände genutzt (FLI 2020b). Zur Erreichung des bereits erwähnten pH-Bereichs von >12 über einen längeren Zeitraum, sind je nach Pufferkapazität des Umgebungsmediums verschiedene Mengen an Kalk sowie eine entsprechende Menge an Wasser notwendig. Weiterhin wird Kalk durch die Empfehlungen des FLI zur Desinfektion bei Tierseuchen offiziell zur Bekämpfung der ASP angewandt (FLI 2020d). Auch in der Forstwirtschaft findet Kalk in der Bodenbearbeitung Anwendung. Generell erfordert der Umgang mit Kalkprodukten aufgrund ihrer ätzenden Wirkung auf Haut bzw. Schleimhaut strenge Arbeitsschutzmaßnahmen (Mundschutz, Handschuhe, Schutzbrille etc.).



Abb. 2 pulvriger Kalk

2.3.3.1 Branntkalk (CaO)

Im Gegensatz zu reinem Löschkalk und Kalkmilch erfolgt die desinfizierende Wirkung von Branntkalk zusätzlich durch eine Erwärmung beim Ablöschvorgang. Branntkalk (Calciumoxid) entsteht beim Brennen aus Calciumcarbonat. In Kontakt mit Wasser reagiert das Gemisch mit Branntkalk stark exotherm und erreicht infolgedessen Temperaturen von bis zu 80°C. Diese starke Erhitzung beim Ablöschvorgang macht zusätzliche Arbeitsschutzmaßnahmen notwendig (hitzebeständige Kleidung, Schutzbrille etc.).

Zusätzlich desinfizierend wirkt die beim Ablöschen entstehende Lauge (= Calciumhydroxid) über die Erhöhung des pH-Wertes. Insbesondere in der Festmistdesinfektion findet Branntkalk Anwendung (FLI 2020b). Bei zu hoher Wasseranwendung wird von einer zu schnellen Abkühlung der Löschreaktion bzw. Abschwemmung des Kalks berichtet (SCHNEIDER 1992).

2.3.3.2 Löschkalk (Ca(OH)₂)

Die Herstellung von pulvrigem Löschkalk (Calciumhydroxid) erfolgt über das Brennen von Calciumcarbonat sowie das anschließende, namensgebende „Löschen“ des entstandenen Calciumoxids mit Hilfe von Wasser. Durch seine einfache und zuverlässige Handhabung wird Löschkalk in der Geschichte der Tierseuchenbekämpfung seit Jahrzehnten zur Desinfektion von Stallanlagen verwendet. Insbesondere zur Bekämpfung der Aviären Influenza wird Löschkalk gängig zur Desinfektion von Geflügelställen genutzt (ANON. 2007a, RUENPHET et al. 2019). Gegen ASFV zeigt Löschkalk bereits nach einer Stunde bei Raumtemperatur eine hervorragende desinfizierende Wirkung (CARLSON et al. 2020).

Weiterhin wird die Lösung aus Löschkalk und Wasser als Kalkmilch bezeichnet. In der Literatur werden Anwendungskonzentrationen von bis zu 40% empfohlen (HAAS 1995). Auch hier tritt die keimreduzierende Wirkung über die längerfristige Erhöhung des Umgebungs-pH-Wertes ein. Kalkmilch wird vor allem in Verbindung mit infektiösem Flüssigmist (KOCH M.A. 1984, SCHMITZ 2020) oder Teichanlagen (BERG 1973) verwendet. Generell weisen Bakterien, Viren und Prionen (proteinaceous infectious particles; TSE-auslösende, fehlgefaltete Proteine) eine Empfindlichkeit gegenüber Kalk auf.

Die Desinfektion mit Kalk wird aufgrund seiner universellen und gleichbleibenden Wirkungsweise seit Jahrzehnten auf und in Böden angewandt. Dies ist insbesondere für die sichere Desinfektion von Waldböden von Vorteil, da diese in ihrer Struktur sowie Zusammensetzung erheblich variieren können.

2.4 Bodenbeschaffenheit

Generell bestehen Erdböden aus vielen Schichten; sogenannten Bodenhorizonten. Die oberste Schicht besteht stets aus zersetztem organischem Material unterschiedlicher Herkunft, Beschaffenheit, Lagerungsdichte, Dicke sowie Zersetzungsgrad. Dieses Material ist vor allem pflanzlichen und tierischen Ursprungs. Insbesondere im Wald ist die Charakteristik des obersten Bodenhorizonts maßgeblich vom vorherrschenden Baumbestand abhängig. Darunter liegen die mineralischen Bodenhorizonte, beginnend mit dem mineralischen Oberboden mit unterschiedlicher humoser Einlagerung. Der mineralische Bodentyp variiert. Weiterhin verringert sich mit fortschreitender Bodentiefe der Gehalt an organischem Anteil (siehe Abb. 3).

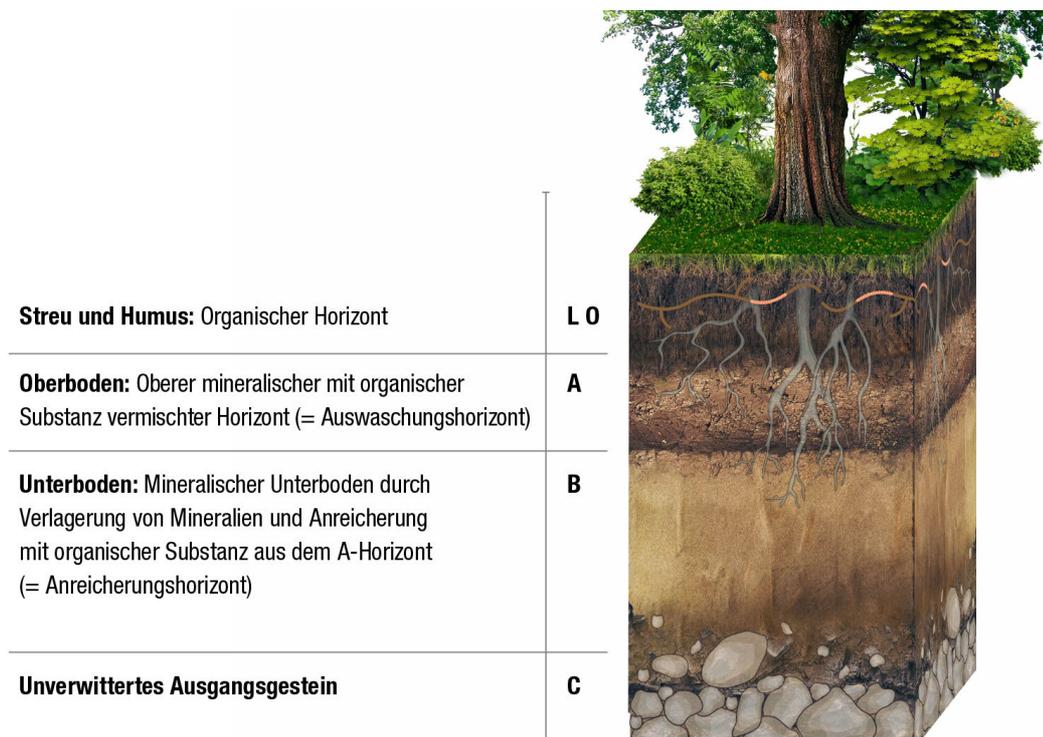


Abb. 3 allgemeiner Aufbau von Erdböden (Copyright nach BayWa (STIFTUNG 2021), Freigabe des Fotos durch die BayWa - Stiftung am 18.10.2021)

2.4.1 Humushorizont

Der sogenannte Humushorizont bildet stets die oberste Schicht eines Erdbodens. Somit hat er die höchste Wahrscheinlichkeit eines direkten Kadaverkontakts. Humus besteht aus abgestorbenem organischem Material pflanzlichen und tierischen Ursprungs und kann, je nach Zersetzungsgrad und Bestandteilen, in bis zu drei Unterschichten unterteilt werden. Hierzu zählen die Streuschicht (L), bestehend aus wenig bzw. unzersetztem Laub, die einen sehr geringen Anteil (<10%) an fein

zersetztem Humusmaterial (Feinhumus) enthält (ANON. 2016b). Die darauffolgende Humusschicht (Of = Vermoderungshorizont) besteht aus 10-50% Feinhumus, wobei der Feinhumusanteil im Horizont von oben nach unten zunimmt. Im Übergangsbereich zur darunterliegenden Humusschicht (Oh = Humusstoffhorizont) liegt ein Feinhumusanteil von bis zu >70% vor. Seine Färbung ist in aller Regel nahezu schwarz, unter Umständen jedoch auch rotbräunlich bis schwarztötlich (ANON. 2016b).

Insgesamt kann ein Humushorizont je nach Standort eine Mächtigkeit von wenigen Millimetern bis mehrere Zentimeter aufweisen. Nicht an allen Standorten sind alle drei Unterschichten vorzufinden. Die Humusform kennzeichnet die gesamte Einheit an Humushorizonten eines Bodenprofils. Als Humusform kommen Mull, Moder oder Rohhumus bzw. Mischformen infrage. Als Mull gilt Humus aus leichtzersetzbaren Streuschicht, welche schon bis zur Mitte eines Jahres abgebaut worden ist (ANON. 2016b). Sowohl Moder als auch Rohhumus zeichnen sich durch langsamere Zersetzungsprozesse aus. Je höher der Stickstoffanteil und geringer der Kohlenstoffanteil organischer Reste ist (C/N-Verhältnis), desto schneller verlaufen die Zersetzungsprozesse und umso besser ist der entstehende Humus für die umliegende Vegetation verwertbar (SCHACHTSCHABEL 2010). Insbesondere die Streu von Laubbäumen weist einen hohen Stickstoffgehalt auf und kann leicht zersetzt werden; die Streu von Nadelgehölzen wie Fichten kann aufgrund ihres hohen Kohlenstoffgehaltes nur sehr langsam zersetzt werden. Entsprechend liegt in Mull der höchste und in Rohhumus der niedrigste Stickstoffgehalt vor.



Abb. 4 Übersicht der beprobten sächsischen Waldstandorte mit nummerierter Bezeichnung nach Quellen des Staatsbetrieb Sachsenforst (Aufnahmen aus dem März 2020)

2.4.2 Mineralischer Oberboden

Der obere Mineralboden-Horizont (0-5 cm) ist die nachfolgende Schicht unter dem Humushorizont und die erste Bodenschicht mit vermehrt anorganischem Anteil. Er kann von wühlenden Wildschweinen im Rahmen der Nahrungssuche bzw. in den Suhlenbereichen erreicht werden und somit ggf. direkt kontaminiert werden. Er besteht hauptsächlich aus variierenden mineralischen (= anorganischen) Bestandteilen, jedoch noch mit verhältnismäßig hoher organischer Beimischung aus dem darüberliegenden Humushorizont, was zu Humuseinwaschungen im oberen Mineralboden führt (A/Ah) (SCHACHTSCHABEL 2010). Weiterhin kann ebenso die Körnunggröße der Mineralbestandteile variieren, von Kies (>2 mm), Sand (0,063 – 2 mm), Schluff (0,002 – 0,063 mm) bis Ton (<0,002 mm) (SCHACHTSCHABEL 2010). Mit der Körnung ergibt sich auch die Porengröße; d.h. der Raum zwischen den einzelnen Bodenpartikeln. Je geringer die Porengröße, desto höher die Wasserbindungsfähigkeit eines Bodens (SCHACHTSCHABEL 2010).

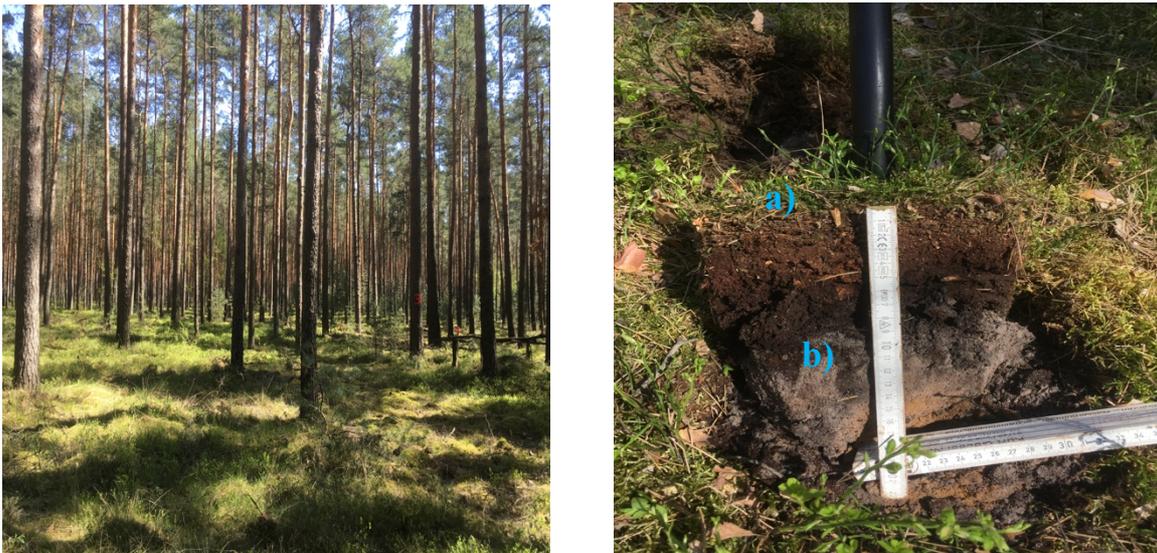


Abb. 5 beispielhafte Darstellung eines beprobten Kiefernwaldes (links) mit Anstich des Humus- (a) sowie oberen Mineralboden-Horizonts (b)

2.5 ASFV in Böden

Zum jetzigen Zeitpunkt ist das Verhalten bzw. die Desinfektion von ASFV in Erdböden weitestgehend unerforscht. Auf Humus- und Sandboden gelagerte, ASFV-kontaminierte Überreste von Schweinen bleiben bei einer Temperatur von -20°C bis zu 3 Monate lang infektiös; bei 4°C bis zu 12 Monate (FISCHER 2020). Eine andauernde Infektiösität des darunterliegenden Bodenmaterials ist somit nicht auszuschließen. Neuste Studien haben gezeigt, dass ASFV in sterilem Sand maximal drei Wochen infektiös bleibt. Bei verschiedenen unsterilen Böden bewegt sich die

Überlebenszeit des Virus zwischen drei Tagen und zwei Wochen. Lediglich aus sauren Waldböden konnte zu keiner Zeit aktives Virus zurückgewonnen werden (CARLSON et al. 2020). Auch in Blattlaub zeigt ASFV lediglich eine stark begrenzte Tenazität (MAZUR-PANASIUK and WOZNIAKOWSKI 2020).

2.5.1 Desinfektion von Böden

Da der Hauptüberträger im außerafrikanischen Raum, das Wildschwein, hauptsächlich in unterholzreichen, bewaldeten Bereichen aufzufinden ist (NIETHAMMER and KRAPP 1986), muss hier ein angepasster Desinfektionsvorgang erfolgen. Der generelle Desinfektionsvorgang von Bodenflächen wird in den Empfehlungen des FLI zur Desinfektion von Tierseuchen, ehemals Desinfektionsrichtlinie, ebenfalls thematisiert. Während es bei der Desinfektion von befestigten Böden die Vorgabe des Einsatzes eines wirksamen Desinfektionsmittels im Volumen von 0,4l/m² bis 1l/m² gibt (FLI 2019, FLI 2020f), fallen die Handlungsanweisungen in Bezug auf unbefestigte (Erd-)Böden deutlich ungenauer aus. Hier erfolgt lediglich der Hinweis auf eine mögliche Durchtränkung von unbefestigten Erdböden mit einem geeigneten Desinfektionsmittel (FLI 2020c, FLI 2020g); eine genaue Mengenangabe liegt nicht vor. Im Rahmen der alten Desinfektionsrichtlinie aus dem Jahr 2007 findet sich der Hinweis auf die Desinfektion mit mindestens 5l/m² eines geeigneten Desinfektionsmittels (ANON. 2007b). Weiterhin wird hierbei jedoch weder die äußerst variable Bodenbeschaffenheit, der Feuchtigkeitsgehalt noch der Kontaminationsgrad von Böden berücksichtigt. Entsprechende strukturierte Untersuchungen zum Verhalten von Desinfektionsmitteln in verschiedenen Böden fehlen bisher.

Weiterhin war das Abgraben kontaminierten Bodenmaterials von 10 cm bis 20 cm Erdtiefe sowie der anschließenden Lagerung und Desinfektion die bisher empfohlene Methode (FLI 2021b). Diese ist jedoch äußerst aufwändig. Es besteht die erhöhte Gefahr der Erregerverschleppung sowie der Umgebungskontamination. Zur direkten Bodendesinfektion sind ausschließlich umweltverträgliche Desinfektionsmittel in Betracht zu ziehen, welche in Verbindung mit Erdböden getestet werden müssen. Somit erfolgt eine zuverlässige, sichere und effiziente Desinfektion bei gleichzeitiger Schonung der Umwelt und mit geringem logistischem Aufwand.

3 Veröffentlichungen

3.1 Veröffentlichung 1

Stellungnahme zum Eigenanteil an der Publikation:

Die Literaturrecherche, die Versuche und deren Auswertung sowie die Erstellung des Manuskripts habe ich eigenständig durchgeführt. Prof. Dr. Uwe Truyen und Dr. Ahmed Abd El Wahed haben mich bei der Versuchsplanung, Datenauswertung und der Anfertigung des Manuskripts unterstützt. Die Versuchsdurchführung mit ASFV erfolgte unter Unterstützung von Dr. Sandra Blome und Dr. Melina Fischer. Das gesamte Manuskript wurde von allen beteiligten Autoren gelesen und überarbeitet.

The efficacy of disinfection on Modified Vaccinia Ankara and African Swine Fever Virus in various forest soil types

Franziska Tanneberger¹, Ahmed Abd El Wahed¹, Melina Fischer², Sandra Blome², Uwe Truyen^{1*}

¹Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig, 04103 Leipzig, Deutschland

²Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Virusdiagnostik, 17493 Greifswald, Deutschland

Eingereicht: 01. September 2021

Akzeptiert: 25. Oktober 2021

Veröffentlicht: 28. Oktober 2021

Viruses **2021**, 13(11), 2173; <https://doi.org/10.3390/v13112173>

Article

The Efficacy of Disinfection on Modified Vaccinia Ankara and African Swine Fever Virus in Various Forest Soil Types

Franziska Tanneberger ¹, Ahmed Abd El Wahed ¹ , Melina Fischer ², Sandra Blome ²  and Uwe Truyen ^{1,*}

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, D-04103 Leipzig, Germany; Franziska.Tanneberger@web.de (F.T.); ahmed.abd_el_wahed@uni-leipzig.de (A.A.E.W.)

² Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, D-17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; Melina.Fischer@fli.de (M.F.); Sandra.Blome@fli.de (S.B.)

* Correspondence: truyen@vetmed.uni-leipzig.de; Tel.: +49-3419738150

Abstract: African swine fever (ASF) has become a global threat to the pig industry and wild suids. Within Europe, including Germany, affected wild boar populations play a major role. Fencing and carcass removal in combination with the reduction in environmental contamination are key to control further spread. The handling of the ASF virus (ASFV) is restricted to high-containment conditions in Germany. According to the regulation of the German Veterinarian Society (DVG), modified vaccinia Ankara virus (MVAV) is the virus of choice to determine the efficacy of disinfection for enveloped viruses. The aim of this study was to use the MVAV as a guide to select the best possible disinfectant solution and concentration for the inactivation of ASFV in soil. Both viruses were tested simultaneously. In this study, two layers (top and mineral soil) of soil types from six different locations in Saxony, Germany, were collected. The tenacity of ASFV and MVAV were tested at various time points (0.5 to 72 h). The capabilities of different concentrations of peracetic acid and citric acid (approx. 0.1 to 2%) to inactivate the viruses in the selected soil types with spiked high protein load were examined under appropriate containment conditions. Around 2–3 Log₁₀ (TCID₅₀) levels of reduction in the infectivity of both ASFV and MVAV were observed in all soil types starting after two hours. For MVAV, a 4 Log₁₀ loss was recorded after 72 h. A total of 0.1% of peracetic acid (5 L/m²) was sufficient to inactivate the viruses. A 4 log₁₀ reduction in the infectivity of MVAV was noticed by applying 1% citric acid, while a 2 log₁₀ decline was recorded with ASFV. In conclusion, comparing MVAV to ASFV for efficacy screening of disinfectant solutions has revealed many similarities. Peracetic acid reduced the infectivity of both viruses independently of the soil type and the existence of a high organic soiling.

Keywords: African swine fever virus; modified vaccinia Ankara virus; soil; disinfectant



Citation: Tanneberger, F.; Abd El Wahed, A.; Fischer, M.; Blome, S.; Truyen, U. The Efficacy of Disinfection on Modified Vaccinia Ankara and African Swine Fever Virus in Various Forest Soil Types. *Viruses* **2021**, *13*, 2173. <https://doi.org/10.3390/v13112173>

Academic Editor: Manuel Borca

Received: 1 September 2021

Accepted: 25 October 2021

Published: 28 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Over the last decade, the hemorrhagic contagious disease ASF has changed from an exotic disease of Sub-Saharan Africa to a considerable and tangible threat to the pig industry in Central Europe and Asia. The causative agent is a large, enveloped virus (175–215 nm) containing a genome of double-stranded DNA of 170–194 Kbp in length and belongs to the *Asfarviridae* family [1]. With its reintroduction into the European Union in 2014, the disease has also apparently found a fertile breeding ground in the abundant wild boar population. Based on previous experience on the Iberian Peninsula and Sardinia, wild boars were thus far not considered as a major and long-term reservoir for ASFV [2,3], and self-sustaining cycles were not anticipated in the beginning [4]. However, disease dynamics were completely different under the Northeastern European conditions and long-lasting endemic cycles without domestic pig involvement were established in all the affected countries once the virus was introduced into the wild boar population. Within the European Union and neighboring countries, wild boar populations in Bulgaria, Germany,

Estonia, Latvia, Lithuania, Poland, Romania, Serbia, Slovakia, Ukraine and Hungary are currently affected [5].

Despite the high virulence of the viruses and considerable mortality among wild boar, these cycles have been self-sustained over several years now. In the absence of an oral vaccine or other direct means of therapy, control has to rely on hygiene measures including fencing, the removal and safe disposal of carcasses and a reduction in the susceptible population in adjacent areas [6,7]. Given the high tenacity of the virus in the environment [8,9], decontamination of the deathbed (soil/ground beneath the carcass) has been discussed. Soils in wild boar habitats have often a rather acidic pH that could lead to inactivation of ASFV, as was demonstrated by Carlson et al. [10]. However, decontamination is still recommended, and disinfection is complex as soil encompasses many organic contents, which influence the potency of disinfectants.

The most commonly used disinfectants are based on peracetic acid, formic acid, sodium hydroxide, citric acid or slaked lime/quick lime [11]. The concentration and route of application depend on the target surface, the ambient temperature and chemical properties (e.g., pH) [12,13].

In Germany, only commercial chemical disinfectants that are efficacy-tested according to German Veterinary Society (DVG) guidelines can be used for official disinfection procedures. The biosafety level of ASFV hampers extensive studies. According to the DVG protocols, MVAV is used as a test virus for efficacy testing as a representative of the enveloped viruses [14].

In this study, in a BSL-2 laboratory, the tenacity of MVAV and the inactivation with various concentrations of peracetic acid and citric acid were examined in two layers (topsoil, TS; and mineral soil, MS) of six soil types collected in the state of Saxony, Germany. The outcomes of this experiment were validated under high containment conditions using ASFV. The experimental setup is depicted in Table 1.

Table 1. Experiment layout.

Virus	BSL	Part of Soil	Types of Soil	Depth for Tenacity	Tenacity Times	Disinfection (5 L/m ²)
MVAV	BSL-2	topsoil; mineral soil	6	0.5 cm; 5 cm	0.5; 1; 2; 24; 72 h	0.1; 0.5; 1% citric acid 0.001; 0.01; 0.1% peracetic acid
ASFV	BSL-4	topsoil; mineral soil	6	0.5 cm; 5 cm	2; 24; 72 h	1% citric acid 0.1% peracetic acid

2. Materials and Methods

2.1. Soil Types

Various soil types were collected from different regions in Saxony, Germany (Table 2). The sampling and characterization of soil types and quality were performed under the supervision of the Sachsenforst, Pirna, Germany. For each soil, TS and lower sandy layer MS were collected. The soil samples were stored in airtight plastic bags and/or buckets at 10 °C. Freedom of ASFV and MVAV was confirmed using a quantitative polymerase chain reaction (qPCR, see below) for all soil samples. In addition, at the time of collection (April 2020), Germany was listed free of the virus by the (World Organization for Animal Health) OIE.

Table 2. List of the soil collected from different locations in Saxony, Germany.

ID *	Collection Site	Forest Stand	pH Topsoil	pH Mineral Soil
277	Oberholz/Leipzig Süd	deciduous forest, rich in conifers	5.32	5.53
295	Taura/Schöneiche	pine forest	4.03	3.92
30	Klitten/Bautzen	pine forest	4.01	4.32
171	Marienberg/Heinzebank (Erzgebirgskreis)	spruce forest	5.75	4.69
141	Bärenfels/Hetzdorf (Sächsische Schweiz/Osterzgebirge)	spruce forest	4.24	3.91
89	Ottendorf	coniferous forest, rich in deciduous trees	4.01	4.32

* official names by the authority of Sachsenforst, Pirna, Germany.

2.2. Viruses and Cell Cultures

MVAV was propagated in chicken embryo fibroblasts to obtain a titer of approximately 10^8 TCID₅₀/mL or higher. The cultivation was conducted at 37 °C and 5% CO₂ in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, PAA Laboratories, Pasching, Austria), 1% l-glutamine, 1% non-essential amino acids, penicillin (100 IU/mL; Biochrom, Berlin, Germany) and streptomycin sulphate (100 lg/mL; Biochrom). Virus titration was performed by microscopically assessing the virus-specific for cytopathogenic effects (CPE) for up to 8 days to determine the 50% tissue culture infectious doses (TCID₅₀) according to the Spearman-Kärber method.

A tissue culture adapted ASFV strain originating from the ASFV strain "Estonia 2014" [15] (virus passage 15) with a titer of $10^{6.75}$ TCID₅₀/mL was used for ASFV proof-of-concept studies. The ASFV-permissive wild boar lung cell line WSL-R-HP (CCLV-RIE 1346, FLI Insel Riems, Greifswald, Germany) was used for virus propagation (DMEM (E, high-glucose, 4.5 g/L)). The TCID₅₀ was determined by indirect immunofluorescence after 3 to 4 days using a commercial p72 specific antibody (Ingenasa, Madrid, Spain) and an Alexa 488 conjugate goat anti-mouse IgG (H + L) (Fisher Scientific, Schwerte, Germany).

2.3. Tenacity of the Viruses

To examine the stability of MVAV and ASFV in soil, the viruses were dried on stainless steel germ carriers and buried at 0.5 and 5 cm in the TS and MS of the six soils. Briefly, the MVAV or ASFV was mixed with FCS (PAA Laboratories, Pasching, Austria) to obtain a protein load of 40% in the mixture. The mixture was spread on the sterile steel germ carriers (50 µL for 10^8 TCID₅₀/mL MVAV and 250 µL for 10^6 TCID₅₀/mL ASFV) and air dried under the laminar flow at 20–22 °C for 30–60 min. Thereafter, the virus-germ carrier was buried at 0.5 and 5 cm under the soil in a sterile glass beaker (diameter of 5 cm). The beakers were incubated at 10 °C for 0.5, 1, 2, 24 and 72 h for MVAV, and 2, 24 and 72 h for ASFV. To recover the remaining viruses, the germ carrier was subsequently washed 15 times with 5 mL of chilled PBS for MVAV carriers and 2.5 mL for ASFV carriers. The collected fluid was filtered through a 0.45-micrometer syringe filter. A ten-fold serial dilution of the filtrate was prepared and 100 µL was used for determining the TCID₅₀. In addition, DNA was extracted from the samples and examined using a qPCR. The stability of the viruses at various time points in each soil type and layer were examined at least 9 times for MVAV and 3 times for ASFV. The TCID₅₀ values were subtracted from the control, which was represented by a germ carrier dried without contact with soil.

2.4. Disinfection in Soil

The following two commercially available chemical disinfectant substances were examined that are recommended by the DVG for use in animal diseases: peracetic acid (15% stock solution, pure, AppliChem, Darmstadt, Germany) and citric acid (192.13 g/mol, pure, anhydrous, Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Both disinfectants were diluted to obtain concentrations of 2, 1, 0.5 and 0.1%. In addition, 0.01% and 0.001% peracetic acid were used. To achieve the maximum performance of the disinfectant, the dilutions were prepared freshly 15 min before the start of the experiment. In contrast to the tenacity experiment, screening of the disinfectants was carried out as a suspension to simulate the real case scenario. Briefly, a volume of 2.7 (width) + 1.5 (height) cm of TS and MS of each of the 6 soil types, corresponding to about 3 mL of soil, depending on the water content, were placed in 50-milliliter centrifuge tubes. Then, 3 mL of virus (10^8 TCID₅₀/mL for MVAV and $10^{6.75}$ TCID₅₀/mL for ASFV) and 4 mL of FCS were added. After vortexing for 5 s, 2.9 mL of the disinfectant solution containing 3.4-fold the desired concentration was vortexed for 5 s. As an example, for a final working concentration of 1%, 3.4% of the disinfectant was used. The tube was incubated at 10 °C for 2 h. Thereafter, 2.1 mL of ice-cold PBS was added and mixed. The mix was sonicated in an ultrasound bath (Bandelin Sonorex Super RK 103 H, Berlin, Germany) at 4 °C for 5 min. To obtain the supernatant, the mixture was centrifuged at 4500 rpm and 4 °C for 5 min. Around 5 mL of the supernatant was filtrated (Filtropour 0.45 µm, Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Ten-fold serial dilutions were prepared and added to cell culture to determine the loss of infectivity. Generally, 100 µL was applied to the cells in a 96-well plate. To avoid cell toxicity, in some cases, 25 µL was applied to either 24- or 96-well plates. At the same time, qPCR was conducted using the soil supernatant. The experiment for each concentration of the disinfectant solution in each soil type and layer were conducted in duplicates. In the control soil, PBS was used instead of the disinfectant solution.

2.5. Disinfectant Volume Tests

The German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) recommended 5 L/m² of the final concentration of the disinfectant solution on surfaces [16]. In order to determine the penetrability of the disinfectants in various soil types, a germ carrier containing MVAV was buried at a 0.5- and 5-centimeter depth. Briefly, a 250-microliter mixture of 150 µL of 10^8 TCID₅₀ MVAV and 100 µL of FCS were pipetted onto the germ carrier and air dried under the laminar flow at room temperature for 60 min. The virus-germ carrier was buried 0.5 and 5 cm under the soil in sterile perforated plastic boxes (diameter of 12.5 + 10.5 + 7 cm). A total of 65 mL of 0.5% peracetic acid was added. In the control boxes, water with standardized hardness level (WSH) was used [17]. The boxes were incubated at 10 °C for 2 h. The germ carrier was removed and washed 15 times with 2.5 mL of chilled PBS, then filtrated through a 0.45-micrometer sterile filter. A tenfold serial dilution of the flow was prepared and 100 µL was used for determining the TCID₅₀. In addition, qPCR was conducted. For each depth and soil type, four values were determined.

2.6. DNA Extraction and qPCR

Nucleic acids from 200 µL of supernatant of germ carrier or soil suspension were extracted using the DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. MVAV qPCR was performed using a Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) and EvaGreen (Jena Bioscience, Jena, Germany) on an Mx3000 p real-time cycler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Synthetic molecular DNA Standard was produced by GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, GenBank accession number MK314713.1, nucleotide 147538 to 148127) and a serial dilution of 10^5 – 10^1 was applied for DNA quantification. The reaction total volume was 25 µL, containing 1 µL of each MVAV primer (10 µM) published previously [18] and 0.1875 µL of EvaGreen. The temperature profile was a 15-minute initial activation at 95 °C, followed by 40 cycles of

denaturation for 10 sec at 95 °C, annealing/extension for 20 s at 55 °C and elongation for 20 s at 72 °C, as recommended by the manufacturer.

In case of ASFV, nucleic acids from the samples were extracted on a KingFisher 96 flex platform (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) using the NucleoMag Vet kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleic acids were analyzed using qPCR (King et al., 2003) in combination with an internal control based on an EGFP detection system [19] on a Bio-Rad CFX real-time cyler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A genomic ASFV DNA standard was used for determining the genome copy numbers of the samples.

3. Results

3.1. MVAV and ASF Tenacity in Soil

The virus-covered germ carriers were buried in two different layers (0.5 and 5 cm) of six forest soil types from Saxony, Germany for up to 72 h. In general, a maximum titer reduction of ± 2 –3 log levels was recorded for MVAV and ASFV (Figure 1). While the MVAV tenacity was reduced dramatically after 72 h, ASFV was more stable. Despite the 0.5 log difference between the stabilities of the viruses in TS and MS, no other significant variation was recorded. This is also true for all the soil types. Interestingly, no differences between the viral load between the control and the buried germ carrier were recorded using qPCR, which indicates a true loss of infectivity rather than the removal of virus particles (Supplementary File S1).

3.2. MVAV and ASFV Inactivation in Soil

Various concentrations of disinfectant solutions were used to inactivate MVAV and ASFV in the presence of high organic soiling (40% protein load, FCS). For peracetic acid, 0.1% was sufficient to reduce the MVAV viral titer by four log levels, whereas 1.0% of citric acid was required to achieve the same reduction (Figure 2). The disinfectant solution behaved similarly in both TS and MS for MVAV. In contrary, for ASFV, 0.1% peracetic acid overperformed the 1.0% citric acid in both TS and MS (Figure 2). MVAV was inactivated in all types of soils without any significant differences, while variations were observed between the soil types with ASFV (Figure 2). The viral load as determined using qPCR for both the control and the experimental set revealed very close values (Supplementary File S1).

3.3. Penetration of the Disinfectants in Soil

Around 5 L/m² of the disinfectants was sufficient to inactivate the viruses in the soil/MVAV/FCS suspension. The effectiveness of the disinfectant solution at various soil levels was examined by burying the MVAV germ carrier in 0.5 and 5 cm of TS and MS of each soil type. A sufficient reduction in the virus was only noticed at the 0.5-centimeter depth for all the soil except TS of 277 and 295 as well as MS of 295. At the 5-centimeter depth, no reduction was recorded. The TCID₅₀ of both the control and the soil after disinfection remained the same for every soil (Figure 3).

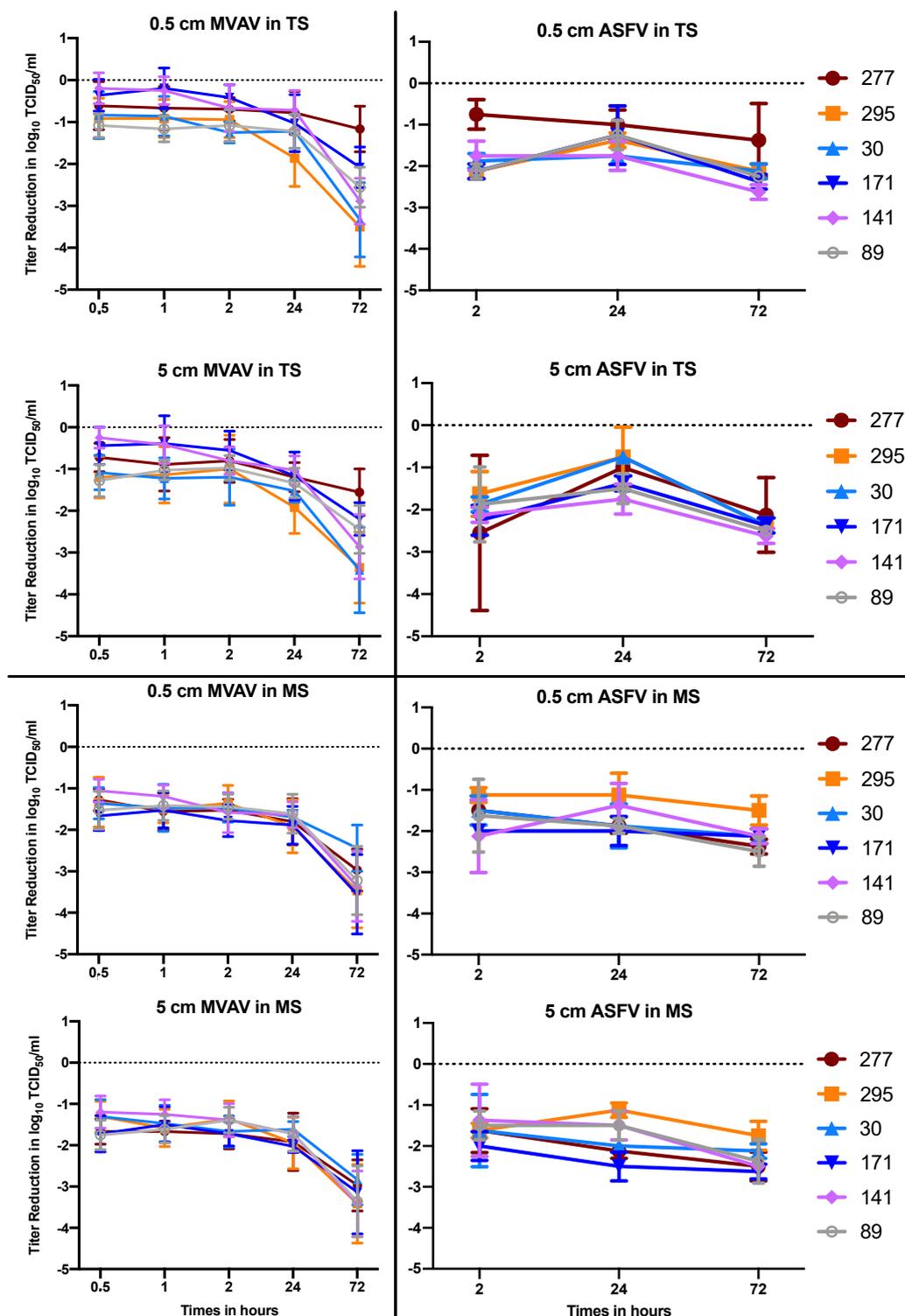


Figure 1. Comparison of the tenacity of MVA (left) and ASFV (right). Top 4 panels are topsoil (TS) and lower 4 panels are mineral soil (MS). The mean value and standard deviation of at least double measurements are shown for each test point.

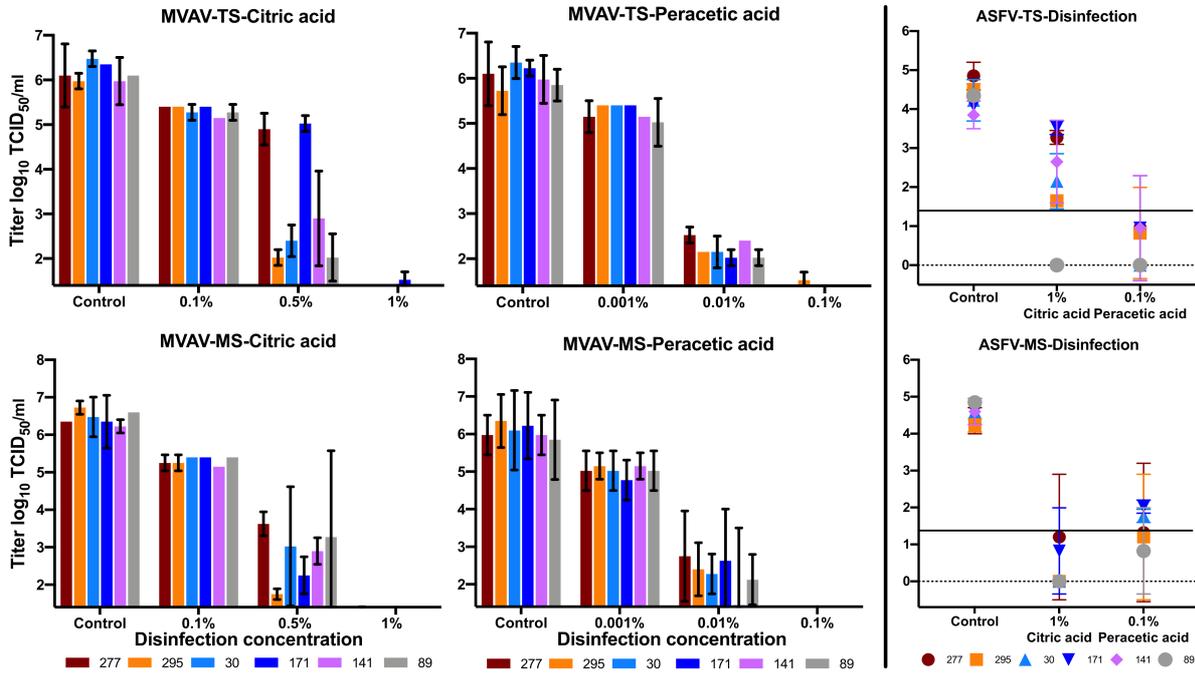


Figure 2. Comparison of the disinfection of MVAV and ASFV (limit of detection $10^{1.4} \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$). Top 3 panels are topsoil (TS) and lower 3 panels are mineral soil (MS). The mean value and standard deviation of at least double measurements are shown for each test point. The virus titers were calculated in the case of the MVAV by CPE and in the case of the ASFV by immunofluorescence. Therefore, different evaluation schemes were used.

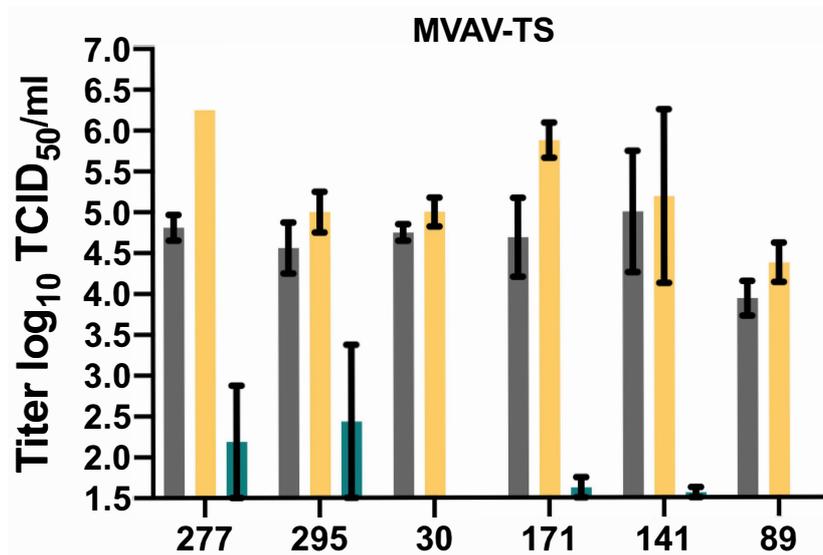


Figure 3. Cont.

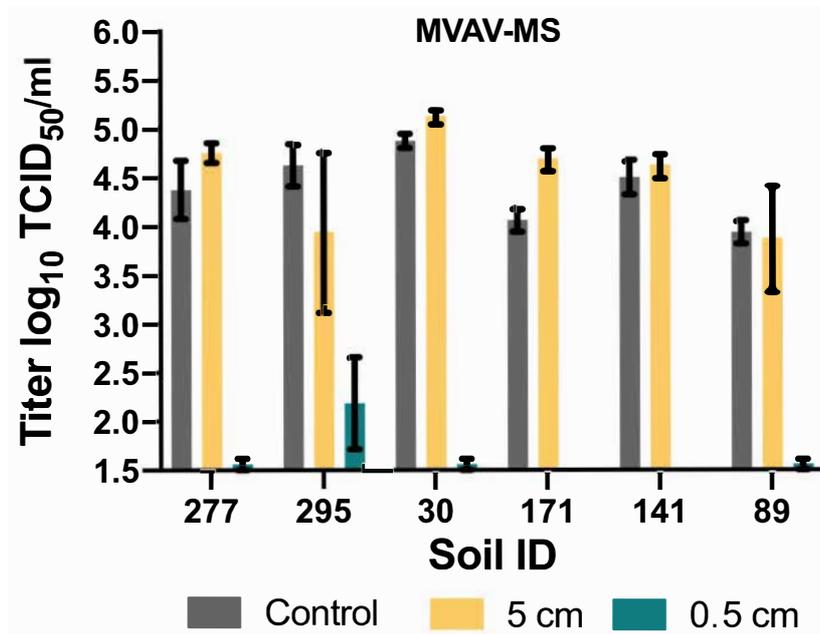


Figure 3. Penetrability of 0.1% peracetic acid on MVA-germ carriers at 0.5- and 5-centimeter depth in (top panel) in topsoil (TS), (lower panel) in mineral soil (MS); limit of detection $10^{1.5}$ log₁₀ TCID₅₀/mL.

4. Discussion

In the context of the current epidemic, several outbreaks started in wildlife with one of the most recent examples being Germany. Here, cases are currently observed in Brandenburg and Saxony [20]. The careful and complete disposal of carcasses of wild boar that succumbed to disease, as well as the removal or treatment of the contaminated soil under or around the carcass are necessary as recommended by the BMEL and the OIE [21,22]. An approach to minimize both the contact probability and movement of contaminated soil is the disinfection of the soil on site. Therefore, in a controlled experiment, we have screened the tenacity of both MVAV and ASFV in TS and MS of six different forest soils in Saxony, Germany. For MVAV and ASFV, a loss of titer by 2–3 log TCID₅₀ levels can be observed after two hours independent of the soil type. Surprisingly, the effect of disinfection on MVAV and ASFV differed. To support the virus reducing effect of the forest soil (pH 4–6), our study started with the acidifying, environmentally friendly disinfectants peracetic and citric acid, commonly used during outbreaks of animal diseases. Peracetic acid accomplished around 4 log levels reduction in infectivity of both ASFV and MVAV in all the tested soil types, while only a limited effect was observed for citric acid for ASFV in TS. The mode of action of both disinfectants is very similar (destabilizing the lipid bilayer and denaturation of proteins; [23,24]). The tested soil types had pH values between 4 and 5.5, which have only a limited effect on the viruses (approx. pH 3 or lower will inactivate both ASFV and MVAV depending on protein load and time [23,25,26]). Peracetic acid is active at a wide range of pH values, while citric acid is more effective at a low pH (<3) [24], which may explain the better performance of peracetic acid in our study.

To simulate field conditions, a high protein load of 40% FCS was included and the experiment was performed at a temperature of 10 °C (required temperature for testing the efficiency of disinfectants by DVG [14], and close to the annual average temperature of soil in Saxony). The efficacy of citric acid was markedly decreased in the presence of high protein content or fluctuations in the ambient temperature [24]. The same is reported for peracetic acid [27] but was not observed in our experiment. Peracetic acid is well known for being less effective in the presence of protein contamination such as blood, feces or

pus [27]. We tried to account for this fact in our experiments by adding a large amount of FCS (40%) to the virus inoculum, as it is important to keep in mind the more complex composition of other body excretions.

Selecting environmentally friendly disinfectants is crucial to minimize the pressure on the environment. Citric acid is an organic acid and peracetic acid dissociated to acetic acid, oxygen and water after a few hours [28]. Both have been extensively used in the food industry because of their low toxicity [29,30]. Therefore, both represent examples of eco-friendly substances, even after the application of large quantities.

Slight differences in the infectivity between the MVAV and ASFV were recorded. The reason may be the variation in the approaches that were used in determining the TCID₅₀. In the case of MVAV, a microscopical examination of the cells for typical CPE, consisting of detached, enlarged and rounded cells, was conducted [31,32]. For ASFV, indirect immunofluorescence staining was applied.

Although various soil types were used in the experiment, no differences in virus stability or susceptibility to disinfectants were recognized. The only variations were seen with soils 277 (TS) and 295 (TS and MS), when the MVAV germ carrier was buried 0.5 cm deep in the soil (Figure 1). For the mentioned soil types, we observed a different penetration of the disinfectant due to the lower level of humidity. Therefore, a sufficient volume of disinfectant solution must be applied. The BMEL has previously recommended 5 L/m² on surfaces [16], but this might not be applicable for all soil types. Although the 0.1% peracetic acid did inactivate the tested virus, we recommend using 0.5% peracetic acid to avoid the dilution effect of the excess humidity or soil water content or a potential loss of efficacy due to interactions with other substances. In other words, the humidity of the soil must be considered before applying any disinfectants.

MVAV was selected as a representative for enveloped viruses by DVG [33]. Both MVAV and ASFV have a complex structure including double envelopes and capsids. Historically, ASFV was assigned to the *Poxviridae* until 1998, when the *Asfarviridae* family was created [34]. The use of MVAV facilitated the conduction of the experiment under BSL-2 laboratory conditions and avoided higher containment requirements, which are legalized for handling ASFV in Germany.

5. Conclusions

This study demonstrates the similarities between MVAV and ASFV susceptibilities to peracetic acid in various forest soil types. More research is needed to screen other disinfectants as well as to investigate the inhibition effect of complex body fluids (e.g., blood) and other organic substances.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13112173/s1>, Supplementary File S1: contains the real-time PCR results.

Author Contributions: Conceptualization, U.T.; methodology, F.T., A.A.E.W., S.B. and U.T.; validation, F.T., A.A.E.W., M.F., S.B. and U.T.; formal analysis, F.T., A.A.E.W., S.B. and U.T.; investigation, F.T., A.A.E.W., M.F., S.B. and U.T.; resources, S.B. and U.T.; data curation, F.T., A.A.E.W., M.F., S.B. and U.T.; writing—original draft preparation, F.T., A.A.E.W. and U.T.; writing—review and editing, F.T., A.A.E.W., M.F., S.B. and U.T.; supervision, A.A.E.W. and U.T.; project administration, U.T.; funding acquisition, U.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The project was funded by Saxon State Ministry for Social Affairs and Cohesion (Project ID: 25170932).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are available in the manuscript and the Supplementary Materials.

Acknowledgments: We acknowledge the financial support by the Saxon State Ministry for Social Affairs and Cohesion and the help with the characterization and definition of the soil types by the state-owned enterprise Sachsenforst. We thank Nadja Leinecker, Dana Rüter and Mario Reinhardt for the expert technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Alonso, C.; Borca, M.; Dixon, L.; Revilla, Y.; Rodriguez, F.; Escribano, J.M. ICTV Report Consortium ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 613–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Laddomada, A.; Patta, C.; Oggiano, A.; Caccia, A.; Ruiu, A.; Cossu, P.; Firinu, A. Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: A serological survey of wild boar and comparison with African swine fever. *Vet. Rec.* **1994**, *134*, 183–187. [[CrossRef](#)]
- Perez, J.; Fernandez, A.I.; Sierra, M.A.; Herraes, P.; Fernandez, A.; Martin de las Mulas, J. Serological and immunohistochemical study of African swine fever in wild boar in Spain. *Vet. Rec.* **1998**, *143*, 136–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lange, M.; Siemen, H.; Blome, S.; Thulke, H.H. Analysis of spatio-temporal patterns of African swine fever cases in Russian wild boar does not reveal an endemic situation. *Prev. Vet. Med.* **2014**, *117*, 317–325. [[CrossRef](#)]
- Animal Disease Information System, A.D.I.S. Available online: https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/animal-disease-information-system-adis_en (accessed on 4 March 2021).
- Authority, E.F.S.; Miteva, A.; Papanikolaou, A.; Gogin, A.; Boklund, A.; Bötner, A.; Linden, A.; Viltrop, A.; Schmidt, C.G.; Ivanciu, C.; et al. Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019). *EFSA J.* **2020**, *18*, e05996. [[CrossRef](#)]
- EFSA; Boklund, A.; Cay, B.; Depner, K.; Földi, Z.; Guberti, V.; Masiulis, M.; Miteva, A.; More, S.; Olsevskis, E.; et al. Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2017 until November 2018). *EFSA J.* **2018**, *16*, e05494. [[CrossRef](#)]
- Kalmar, I.D.; Cay, A.B.; Tignon, M. Sensitivity of African swine fever virus (ASFV) to heat, alkalinity and peroxide treatment in presence or absence of porcine plasma. *Vet. Microbiol.* **2018**, *219*, 144–149. [[CrossRef](#)]
- Mazur-Panasiuk, N.; Zmudzki, J.; Wozniakowski, G. African Swine Fever Virus—Persistence in Different Environmental Conditions and the Possibility of its Indirect Transmission. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 303–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carlson, J.; Fischer, M.; Zani, L.; Eschbaumer, M.; Fuchs, W.; Mettenleiter, T.; Beer, M.; Blome, S. Stability of African Swine Fever Virus in Soil and Options to Mitigate the Potential Transmission Risk. *Pathogens* **2020**, *9*, 977. [[CrossRef](#)]
- Juszkiewicz, M.; Walczak, M.; Mazur-Panasiuk, N.; Wozniakowski, G. Effectiveness of Chemical Compounds Used against African Swine Fever Virus in Commercial Available Disinfectants. *Pathogens* **2020**, *9*, 878. [[CrossRef](#)]
- Gelinas, P.; Goulet, J.; Tastayre, G.M.; Picard, G.A. Effect of Temperature and Contact Time on the Activity of Eight Disinfectants—A Classification. *J. Food Prot.* **1984**, *47*, 841–847. [[CrossRef](#)]
- Krug, P.W.; Davis, T.; O'Brien, C.; LaRocco, M.; Rodriguez, L.L. Disinfection of transboundary animal disease viruses on surfaces used in pork packing plants. *Vet. Microbiol.* **2018**, *219*, 219–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- DVG. *Anforderungstabelle Prüfrichtlinien Tierhaltung*; DVG: Gießen, Germany, 2017.
- Zani, L.; Forth, J.H.; Forth, L.; Nurmoja, I.; Leidenberger, S.; Henke, J.; Carlson, J.; Breidenstein, C.; Viltrop, A.; Hoper, D.; et al. Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Philipp, W.; Hölzle, L.E.; Michels, I.; Menge, C.; Scheinemann, H.A. *Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen—Desinfektion von Unbefestigten und Befestigten Stallböden, Ausläufen, Plätzen und Zufahrtswegen*; BMEL, Ed.; FLI: Greifswald, Germany, 2020.
- Rabenau, H.F.; Schwebke, I. Leitlinie1 der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V.2 und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin Fassung vom 1. August 2008. *Bundesgesundh.-Gesundh.-Gesundh.* **2008**, *51*, 937–945. [[CrossRef](#)]
- Panning, M.; Asper, M.; Kramme, S.; Schmitz, H.; Drosten, C. Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopox viruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 702–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hoffmann, B.; Depner, K.; Schirmer, H.; Beer, M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J. Virol. Methods* **2006**, *136*, 200–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- FLI. African Swine Fever. Available online: <https://www.fli.de/en/news/animal-disease-situation/african-swine-fever/> (accessed on 8 March 2021).
- Franz, J.; Conraths, K.D.; Probst, C.; Sauter-Louis, C.; Beer, M.; Mettenleiter, T.; Blome, S. Maßnahmen im Falle eines Ausbruchs von ASF bei Wildschweinen. Available online: https://www.bauernverband-mv.de/sites/default/files/2018-03/Vortrag2_Prof._Conraths.pdf (accessed on 6 March 2021).
- Guberti, V.; Khomenko, S.; Masiulis, M.; Kerba, S. *African Swine Fever in Wild Boar Ecology and Biosecurity*; FAO Animal production and health manual no. 22; FAO: Rome, Italy, 2019.
- Juszkiewicz, M.; Walczak, M.; Wozniakowski, G. Characteristics of Selected Active Substances used in Disinfectants and their Virucidal Activity Against ASFV. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 17–25. [[CrossRef](#)]
- Hölzle, L.E.; Michels, W.P.I.; Menge, C. *Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen—Ameisensäure, Zitronensäure und Andere Organische Säuren*; BMEL, Ed.; FLI: Greifswald, Germany, 2020.

25. Hale, J.M. A Study of the pH Stability of Vaccinia Virus. *Yale J. Biol. Med.* **1942**, *15*, 241–258. [PubMed]
26. Plowright, W.; Parker, J. The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Arch. Virol.* **1967**, *21*, 383–402. [CrossRef]
27. Scheinmann, H.; Menge, I.M.C. *Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen—Peressigsäure*; BMEL, Ed.; FLI: Greifswald, Germany, 2020.
28. Fauser-Leienser, C. *Verhalten und Desinfektion der Erreger der Europäischen und Afrikanischen Schweinepest Sowie der Maul-und Klauenseuche in Flüssigmist*; Justus-Liebig-Universität Gießen: Gießen, Germany, 2000.
29. Nicolau-Lapena, I.; Abadias, M.; Bobo, G.; Aguilo-Aguayo, I.; Lafarga, T.; Vinas, I. Strawberry sanitization by peracetic acid washing and its effect on fruit quality. *Food Microbiol.* **2019**, *83*, 159–166. [CrossRef]
30. Anastassiadis, S.; Morgunov, I.G.; Kamzolova, S.V.; Finogenova, T.V. Citric acid production patent review. *Recent Pat. Biotechnol.* **2008**, *2*, 107–123. [CrossRef] [PubMed]
31. Joklik, W.K. The poxviruses. *Bacteriol. Rev.* **1966**, *30*, 33–66. [CrossRef] [PubMed]
32. Lukić, A.; Vlašić, M.; Mlinarić-Galinović, G. The cytopathic effect of viruses in cell culture: A staging method. *Med. Vjesn.* **1993**, *25*, 151–155.
33. Dixon, L.K.; Chapman, D.A.; Netherton, C.L.; Upton, C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* **2013**, *173*, 3–14. [CrossRef] [PubMed]
34. International Committee on Taxonomy of Viruses, I. Asfarviridae. Available online: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsna-viruses/w/asfarviridae (accessed on 6 March 2021).

3.2 Veröffentlichung 2

Stellungnahme zum Eigenanteil an der Publikation:

Die Literaturrecherche, die Versuchsdurchführung und -auswertung mit MVA sowie die Erstellung des Manuskripts habe ich eigenständig durchgeführt. Prof. Dr. Uwe Truyen und Dr. Ahmed Abd El Wahed haben mich bei der Versuchsplanung mit MVA und ASFV, der Datenauswertung und der Anfertigung des Manuskripts unterstützt. Die Versuchsdurchführung mit ASFV und entsprechende Datenerhebung erfolgte durch Dr. Sandra Blome, Dr. Melina Fischer, Paul Deutschmann, Hanna Roszyk und Tessa Carrau. Das gesamte Manuskript wurde von allen beteiligten Autoren gelesen und überarbeitet.

Efficacy of liming forest soil in the context of African Swine Fever Virus

Franziska Tanneberger¹, Ahmed Abd El Wahed¹, Melina Fischer², Paul Deutschmann², Hanna Roszyk², Tessa Carrau², Sandra Blome², Uwe Truyen^{1*}

¹Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig, 04103 Leipzig, Deutschland

²Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Virusdiagnostik, 17493 Greifswald, Deutschland

Eingereicht: 17. Januar 2022

Akzeptiert: 27. März 2022

Veröffentlicht: 31. März 2022

Viruses **2022**, *14*(4), 734; <https://doi.org/10.3390/v14040734>

Communication

Efficacy of Liming Forest Soil in the Context of African Swine Fever Virus

Franziska Tanneberger¹, Ahmed Abd El Wahed¹ , Melina Fischer², Paul Deutschmann² , Hanna Roszyk², Tessa Carrau², Sandra Blome²  and Uwe Truyen^{1,*}

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany; franziska.tanneberger@web.de (F.T.); ahmed.abd_el_wahed@uni-leipzig.de (A.A.E.W.)

² Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, Insel Riems, 17493 Greifswald, Germany; melina.fischer@fli.de (M.F.); paul.deutschmann@fli.de (P.D.); hanna.roszyk@fli.de (H.R.); tessa.carraugarreta@fli.de (T.C.); sandra.blome@fli.de (S.B.)

* Correspondence: truyen@vetmed.uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-97-38150

Abstract: Since September 2020, Germany has experienced the first ever outbreak of African swine fever (ASF). The first known cases occurred exclusively in wild boar in forest areas in Brandenburg and Saxony; in July 2021, infected domestic pigs were also confirmed for the first time. As wild boar are considered the main reservoir for the virus in the European region, an effective interruption of this infection chain is essential. In particular, the removal and safe disposal of infected carcasses and the direct disinfection of contaminated, unpaved ground are priorities in this regard. For the disinfection, highly potent as well as environmentally compatible disinfectants must be used, which are neither influenced in their effectiveness by the soil condition nor by increased organic contamination. Thus, in this study, slaked lime, milk of lime and quicklime (1% to 10% solutions) were selected for efficacy testing against the test virus recommended by the German Veterinary Society (DVG), Modified Vaccinia Ankara virus (MVAV), and ASF virus (ASFV) in conjunction with six different forest soils from Saxony in two different soil layers (top soil and mineral soil) each. In summary, 10% of any tested lime type is able to inactivate both MVAV and ASFV under conditions of high organic load and independent of the water content of the soil. At least a 4 log reduction of the virus titer in all tested forest soil types and layers and by all applied lime types was observed. In conclusion, the high efficacy and suitability of all tested lime products against both viruses and in the presence of high organic load in forest soil can be confirmed and will help to control ASF spread.

Keywords: African swine fever virus; Modified Vaccinia Ankara virus; soil; disinfectant; lime



Citation: Tanneberger, F.; Abd El Wahed, A.; Fischer, M.; Deutschmann, P.; Roszyk, H.; Carrau, T.; Blome, S.; Truyen, U. Efficacy of Liming Forest Soil in the Context of African Swine Fever Virus. *Viruses* **2022**, *14*, 734. <https://doi.org/10.3390/v14040734>

Academic Editor: Manuel Borca

Received: 17 January 2022

Accepted: 27 March 2022

Published: 31 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

African swine fever virus (ASFV) is one of the most important emerging animal diseases, which spreads rapidly worldwide. From 2007, ASFV spread through Georgia and Russia to the EU in the Baltic states. From there, it continuously spread westwards and in September 2020 the first case in Germany was diagnosed in the state of Brandenburg [1]. Within one year, the cases of the haemorrhagic disease of pigs spread across the states of Brandenburg and Saxony, with more than 2000 cases reported in wild boar one year later [2]. Moreover, three ASF outbreaks were confirmed in Brandenburg domestic pigs in July 2021 [2]. In all cases, local virus variants were also found to be circulated in the wild boar population [3]. Thus, the epidemic in the local wild boar population was the most likely source of these outbreaks. To prevent further spread and economic losses, the German government has implemented strict emergency and hygiene plans in accordance with European legislation (e.g., Commission Implementing Regulation (EU) 2021/605). The control strategy relies on reducing the number of wild boar, fencing of affected areas, monitoring of the susceptible population and proper disposal of infected carcasses [4–6].

Furthermore, the disinfection of potentially contaminated soil beneath and around the ASFV-positive carcasses contributed to the active control measures.

The stability of ASFV in the environment is well documented [7–9]. ASFV belongs to the family of *Asfarviridae*, which is enveloped and can be easily inactivated by commonly used disinfectants like NaOH or formaldehyde [8]. Peracetic acid and citric acid were shown to be highly effective with ASFV contaminated soil [10], but may be of limited efficacy in the presence of blood [11,12]. Nevertheless, screening the effectiveness of other disinfectants is necessary. Various lime products have been used for decades [13–16] and are considered to be promising solutions because of their availability in powdery form and their environmentally friendly characteristics. The approval of the use of disinfectants against specific animal diseases in Germany is nationally regulated and linked to an efficacy testing according to test protocols of the German Veterinary Society (DVG). The DVG has recommended the *Orthopoxvirus* Modified Vaccinia Ankara virus (MVAV) as a representative of enveloped viruses [17]. The aim of the study was to test the disinfection potency of lime according to the guidelines of the DVG on MVAV and try to reproduce the results using ASFV.

In order to determine effective concentrations to inactivate enveloped viruses in contaminated soil, various concentrations of slaked lime ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), quicklime (CaO) and lime milk ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ in water) were tested. We have focused on six soil types in one of the most affected states in Germany, Saxony, and followed the guidelines of the DVG of using MVAV for screening the disinfectants. The most effective concentration was then tested on ASFV contaminated soil under appropriate high containment conditions. In addition, the best water/lime ratio was determined. The experimental layout is presented in Table 1.

Table 1. Experimental layout.

Virus	BSL	Disinfection
MVAV	BSL-2	1%, 5%, 10% slaked lime 1%, 5%, 10% quicklime 1%, 5%, 10% lime milk
ASFV Armenia Δ 258L GFP huCD4	BSL-4	10% slaked lime 10% quicklime 10% lime milk

2. Materials and Methods

2.1. Study Sites and Soil Types

As illustrated in Figure 1, six different soil types across Saxony were selected. For each type, top soil (TS) and mineral soil layer (MS) were collected (Figure 2). For all soil samples, quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR) was performed to proof their freedom of both ASFV and MVAV.

2.2. Disinfection Experiment with Slaked Lime, Lime Milk and Quicklime (Lime Experiments)

Three different lime products were examined in a suspension form: powdery slaked lime (Chemdiscount/WHC, Hilgertshausen, Germany), powdery quicklime (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and lime milk (made by mixing the slaked lime with water at various concentrations). The lime milk was freshly prepared to a stock solution before using in the experiment, representing 3.4-fold the desired final concentration of either 1%, 5% or 10%. A volume of 2.7 (diameter) + 1.5 (height) cm of TS and MS of each of the 6 soil types corresponding to about 3 mL soil were filled in 50-mL centrifuge tubes, and 3 mL of virus (10^8 TCID₅₀/mL for MVAV or $10^{6.75}$ TCID₅₀/mL for ASFV Armenia Δ 258L GFP huCD4 [19]) and 4 mL of fetal calf serum (FCS) were added and mixed for 5 s. To obtain the end concentrations for the powdery disinfectants (slaked lime or powdery quicklime) in the suspension, 0.7 g for 10%, 0.35 g for 5% or 0.07 g for 1% of were added to the mixture of soil, virus and FCS (Supplementary Table S5). In the case of lime milk, 2.9 mL of each of 3.4-fold

concentrated lime milk was added to the centrifuge tubes (Supplementary Table S6). As an example, for a final working solution of 1%, 3.4% of the disinfectant was added. Thereafter, the complete mixture was vortexed for 5 s. After incubation at 10 °C for 2 h, ice-cold PBS was added to generate a final virus dilution of 1:4. The mixture was then sonicated in an ultrasound bath (Bandelin Sonorex Super RK 103H, Berlin, Germany) at 4 °C for 5 min and centrifuged at 4500 rpm at 4 °C for 5 min. The supernatant, approximately, 5 mL was collected and filtrated (Filtropour 0.45 µm, Sarstedt, Nuembrecht, Germany). To determine the loss of infectivity, ten-fold dilutions were prepared and cultivated as described previously [10]. To avoid cell toxicity, in some cases, 25 µL was applied to either 24- or 96-well plates.

The experiment for each concentration of the lime products in each soil type and layer were done in duplicates. For each control, the experimental setup remained the same but without the disinfectant. The final virus dilution of the control suspensions at the end of the experiment corresponds to that of the suspensions with disinfectant. Quantitative real-time PCR to determine the total amount of viral DNA for both MVAV and ASFV were done in all disinfection experiments as described previously [10]. This was done to rule out adhesion of infectious virus particles to sand particles, which would have potentially led to false positive disinfection results due to such reduced recoverability. A true disinfection will lead to a decrease in infectivity (virus titer in TCID₅₀) at a constant DNA genome copy number concentration.

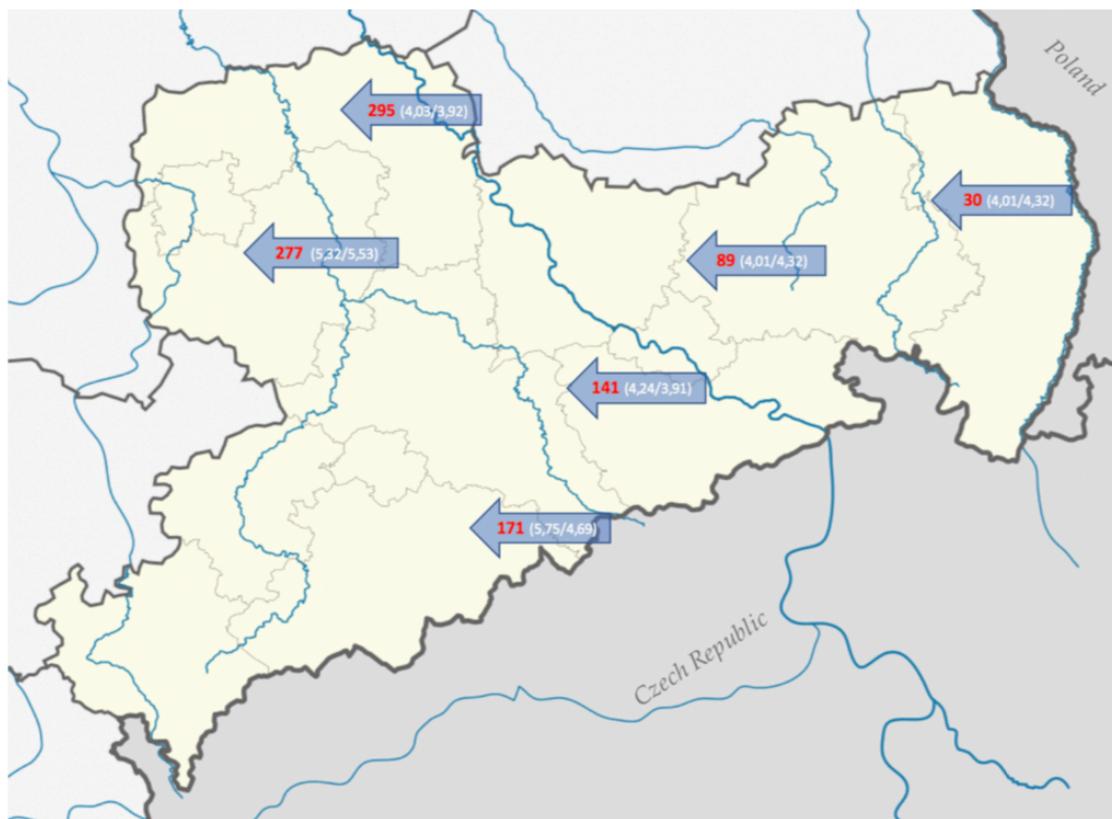


Figure 1. Collection spots of the soil samples. Official names by the authority of Sachsenforst, Pirna, Germany (arrows, red), the numbers in brackets describe the pH of top soil (first number) and mineral soil (second number). Forest stand of soil 277 and 89 is deciduous forest, of 171 and 141 spruce forest and of 295 and 30 pine forest. Map credit [18] (Original Author: TUBS; license link: https://commons.wikimedia.org/wiki/Commons:GNU_Free_Documentation_License,_version_1.2).

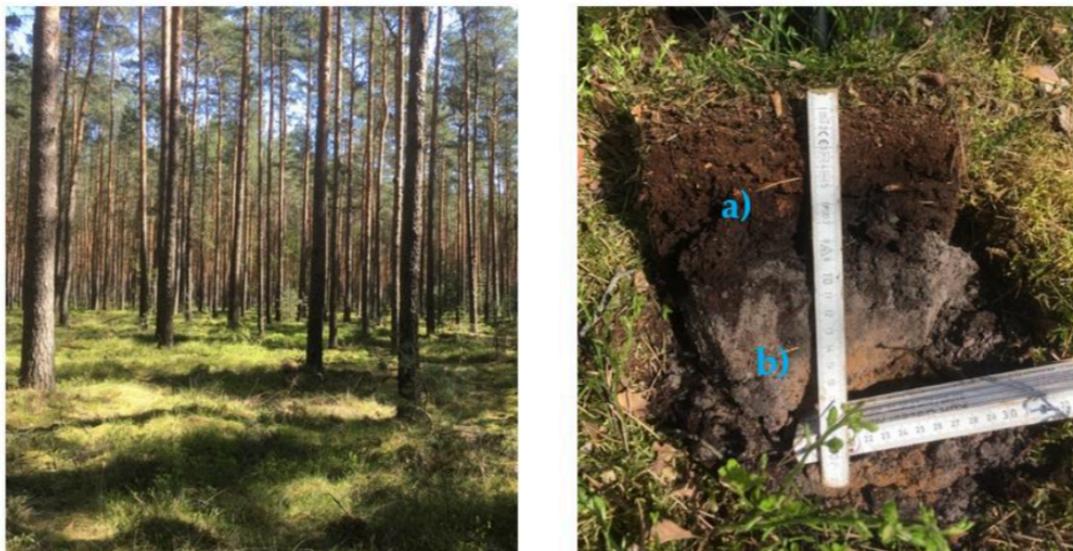


Figure 2. Exemplary representation of a sampled pine forest (left) with the top soil (a) and upper mineral soil (b).

2.3. Lime/Water Ratio

To determine the amount of water needed to activate the powdery lime products (quicklime and slaked lime), various water contents of soil were tested. The same experimental layout for MVAV was performed as above for one MS and one TS with little modifications (Table 2). Briefly, the volume of MVAV was reduced to 1 mL to decrease the water content by using a high titer virus stock. Similarly, FCS was replaced by 0.24 g bovine serum albumin (BSA) in a powder form. The powdery disinfectants were added to the centrifuge tubes containing an equivalent to 3 mL soil in a mass of 0.42 g. After vortexing of the mix for 5 s, one tube was left without adding more water and 420, 840, 1680 and 3360 μL of water with standardized hardness level (WSH) [19,20] was added to reach a ratio of disinfectant of 0 (no further dilution), 1:2; 1:3; 1:5 and 1:9 in the experimental solution. Furthermore, one control tube without disinfectant was prepared (Table 2). The mixture was vortexed again and incubated at 10 °C for 2 h. Subsequently, ice-cold PBS was added to give a final virus dilution of 1:8 in the tubes to stop the disinfectant activity. The supernatant was collected and immediately inoculated into the cell culture system as described previously [10]. DNA extraction and real-time PCR was performed for samples as published previously [10]. Each experiment was performed twice.

2.4. Avoidance of Cell Toxicity

The experimental use of highly potent disinfectants in conjunction with cell cultures can lead to pronounced cell-toxic effects that can severely compromise the validity of results, especially for the exclusive evaluation via cytopathogenic effects (CPE) like in the case of MVA.

While the CPE of MVA appears in the form of swollen, blistered and rounded cell bodies, toxic effects present themselves in the form of black staining (necrosis) and detachment of the cells. Only in case of high-grade cell toxicity, no more healthy cells remain to identify the CPE, which would make correct evaluation impossible.

Extensive preliminary tests were carried out to investigate the toxicity of the different types and amounts of lime on the corresponding cell cultures.

Table 2. Setup and results of lime/water ratio experiments. WSH (water with standardized hardness level) was used in the experiments. The water content has no influence on the efficacy of the liming. No infectious virus was detected after disinfection in any soil type, independent of the water content. The limit of detection is 1.7 Log₁₀ TCID₅₀/mL. Control value is the average of virus concentrations in TS and MS of 277.

Ratio	Soil (mL)	MVAV (mL)	BSA (g)	Slaked Lime or Quicklime (g)	WSH (μL)	PBS (Reaction Stop) (mL)	Total Virus Dilution	Virus Titer (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
0					0	7		ND
1:2					420	6.58		ND
1:3					840	6.16		ND
1:5	3	1	0.24	0.42	1680	5.32	1:8	ND
1:9					3360	3.64		ND
Control				0	0	7		6.04

For this purpose, the respective lime concentrations (1%, 5%, 10%) in the final dilutions used in the experiment were titrated without virus and added to the corresponding cell culture in 96-well plates. The cell culture was incubated and tested for toxicity over 2 h. If cell toxicity (necrosis/detachment of cells) was observed during this time in one or more dilution levels, the respective dilution level was added in addition to a 24-well plate containing cell culture. Again, incubation and observation of toxicity was performed for 2 h. If toxicity was no longer detectable here in the respective dilutions, inoculation of the critical dilution levels could be performed in larger cell culture plates in the main experiment (containing disinfectant and virus). Throughout the experiments, at least one control was titrated per experiment (tube with regular experimental setup and virus but without addition of disinfectant) to ensure a visual comparison between potential cell toxicity and pure CPE. This allowed optimal discrimination between toxic effects and CPE.

3. Results

3.1. Disinfection of MVAV and ASFV with Lime (Lime Experiments)

Various types and concentrations of lime were used to deactivate MVAV in the presence of high organic contents (FCS). For lime milk, quicklime and slaked lime, 10% was sufficient to reduce the viral titer of MVAV by at least 4 logs (Figure 3). Same efficacy was seen against ASFV, as a concentration 10% of all lime types revealed a complete inactivation of ASFV in all soil types tested (Figure 4). The viral load as determined by real-time PCR for both the control and the experimental set revealed similar values (Supplementary Tables S1–S3).

3.2. Lime/Water Ratio

The influence of water contents on the disinfectant's potency was tested. A complete inactivation was observed, when no extra water or up to 16 times the volume of the lime powder extra water was added. The amount of added water had no influence on the inactivation of MVAV in soil (Table 2). The viral load as determined by real-time PCR for both the control and the experimental set (Supplementary Table S4 behaved similar to the viral loads of the lime experiments).

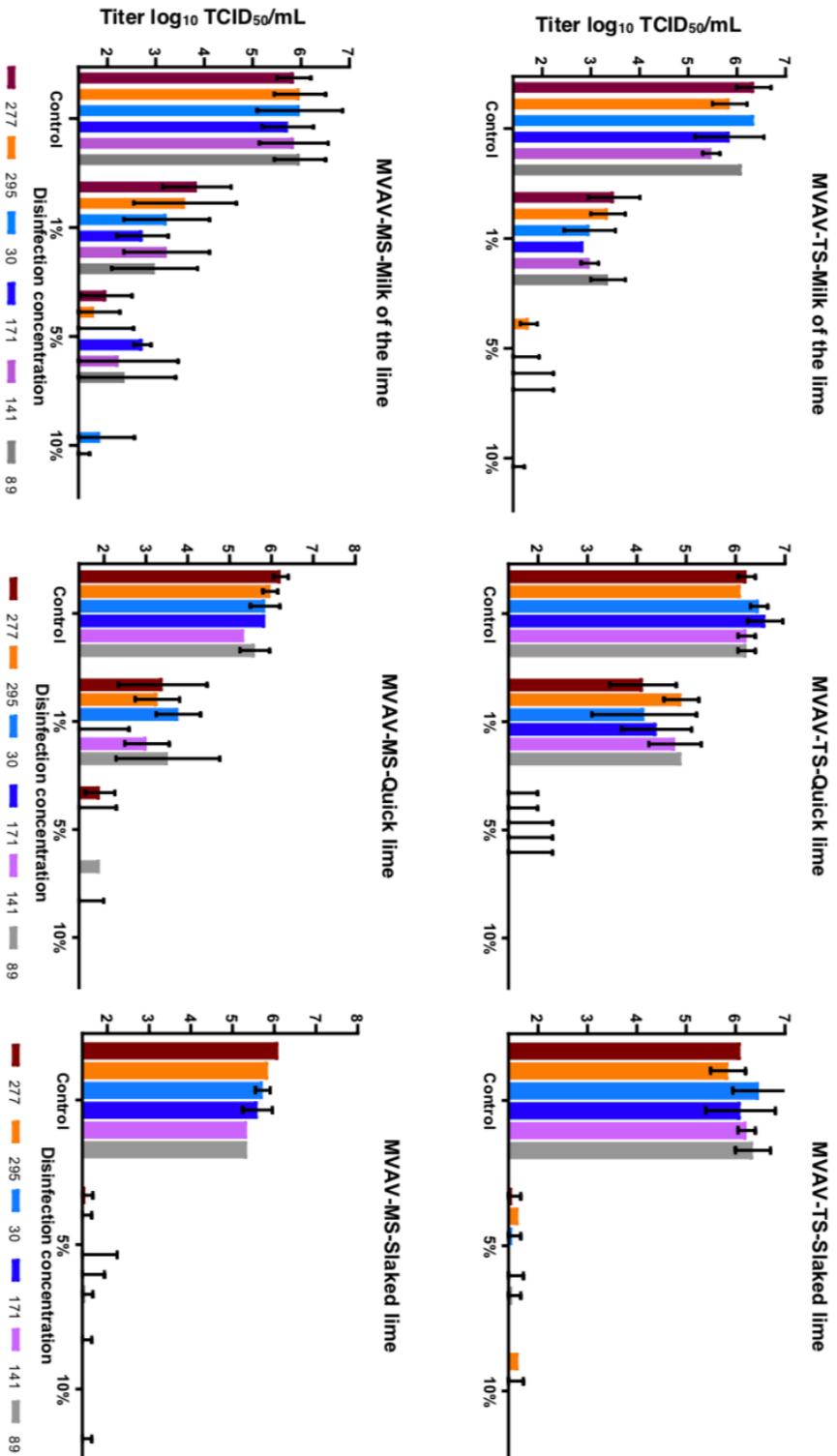


Figure 3. Comparison of the disinfection of MVAV with three different types of lime. Top three panels represent soil (TS) and lower three panels mineral soil (MS). The mean value and standard deviation of at least duplicate tests are shown. Virus titers were calculated by Spearman–Kärber method. Limit of detection was 1.4 log₁₀ TCID₅₀/mL.

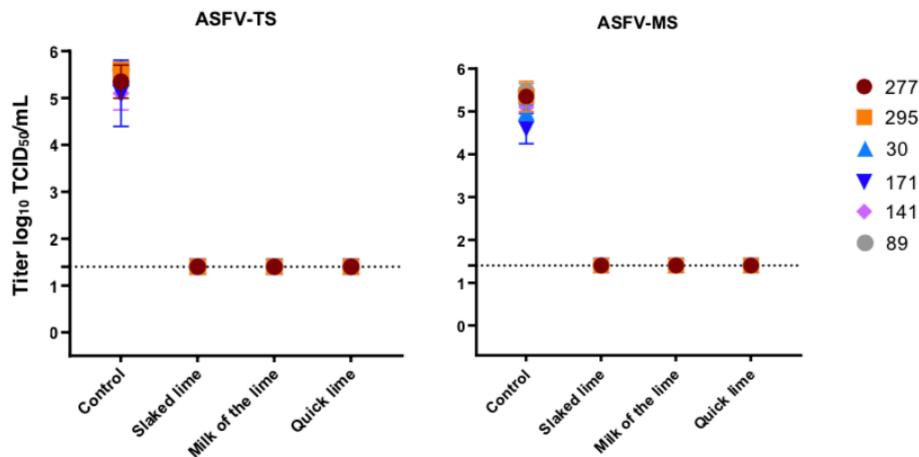


Figure 4. Disinfection of ASFV with three different types of lime in a concentration of 10%. The mean value and standard deviation of at least duplicate tests are shown. Virus titers were calculated by Spearman–Kärber method. Limit of detection was $1.4 \log_{10}$ TCID₅₀/mL.

4. Discussion

Decontamination of soil beneath and around carcasses can play an important role in preventing spread of ASFV. Many studies were conducted on the efficacy of the disinfectants on contaminated solid floor and walls of stables [21–23], but few have been performed on forest soil, which is considered to contribute to the spread of the virus within the wild boar population in Germany. The World Organization for Animal Health (OIE) and the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) recommended the removal of the soil beneath the carcasses under biosecurity measurements [6,24–26]. To avoid further spread of ASFV during handling and transportation of infected soils, the easier and quicker alternative is an effective soil disinfection onsite. In this study, the virucidal effectivity of slaked lime, quicklime and lime milk were examined. The disinfectants were tested first with MVAV as recommended by DVG on six soil types under BSL-2 conditions and applied to the ASFV in a high-containment facilities. At least a $4 \log_{10}$ TCID₅₀/mL inactivation was achieved with 10% for all three tested lime types at 10 °C and an exposure time of two hours. To simulate a field situation, the experiments were done with high organic soiling. In a previous study, 0.1% peracetic acid completely inactivated ASFV in various soil types, while citric acid had only limited efficacy [10]. While blood may reduce the efficacy on peracetic acid performance [11], lime was shown to be effective in the presence of blood, decomposition material or other disruptive substances [27]. Powdery slaked lime and powdery quicklime are commonly used for the disinfection of poultry farms in case of avian influenza virus [28,29]. Lime milk is the disinfectant of choice in the elimination of the infectivity of contaminated slurry [30,31] or ponds [14,31].

The powder form of lime has an advantage of ease of transportation to the affected area and to the target zone in forest, where carcasses are found. Ambient temperature has little to no effect on lime decontamination characteristics [27]. Less or extensive water contents of the matrix can reduce the virucidal properties of powdery lime products [32]. In contrast, in our experiment, water contents did not influence the inactivation of MVAV in soil by powdery lime. Our experiment was designed to reduce the water content of the mixtures as much as possible by using dry soil, BSA in powder form, and a high virus stock in a small volume). However, our study was performed on different soils collected from Saxony, Germany, from areas with varying annual rainfall (656–1146 mm). Therefore, it is highly recommended to test the system before widespread application in a particular environment, country or soil type.

The mechanism behind this class of disinfectants is the alkalization of the matrix (pH up to 12 or higher) [31,33]. This pH level causes the denaturation and coagulation of proteins [31]. Despite the high acid content of soil in Saxony, Germany [10], the pH of the soil after adding the lime was raised to pH 11 to 12 [34]. Furthermore, in the case of quicklime, exothermal reaction with water with a possible heating up to 80 °C will enforce the microbiocidal potency [31]. However, the increased risk of forest fires must be taken into account here, especially in summer. Additionally, special precautions to protect the health of workers must be taken to prevent the potential caustic effect on skin, eyes, lungs and exposed mucosa [31].

DVG in Germany has recommended the MVAV as a representative for enveloped viruses for testing the efficacy of disinfection solutions [17]. A previous study, comparing the efficacy of peracetic and citric acids to inactivate both MVAV and ASFV, has shown only little inconsistency between both viruses [10]. In the experiments described here with the lime products, both viruses are once again showing a very similar behaviour during disinfection under mentioned conditions. Compared to peracetic acid and citric acid, lime is not affected by low ambient temperature or any kind of organic load. This fact makes lime a highly efficient as well as simultaneously cost-effective means of combating ASF.

5. Conclusions

In conclusion, lime (quicklime, slaked lime, lime milk) are effective for the disinfection of forest soil contaminated with ASFV, especially in the presence of high organic soiling.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14040734/s1>. The Supplementary File contains the real-time PCR results. Table S1: qPCR—lime experiments—MVA—Of (top soil) of soil samples 277, 295, 30, 171, 141, 89; Table S2: qPCR—lime experiments—MVA—A (mineral soil) of soil samples 277, 295, 30, 171, 141, 89; Table S3: qPCR—ASFV—lime experiments—Of and A (top soil and mineral soil) of soil samples 277, 295, 30, 171, 141, 89; Table S4: qPCR—lime/water-ratio—MVA—Of and A (top soil and mineral soil) of soil sample 277; Table S5: Final concentrations and added amount of quicklime and slaked lime in experimental layout for lime experiments; Table S6: Stock dilution and final concentrations of lime milk in experimental layout for lime experiments.

Author Contributions: Conceptualization, U.T.; methodology, F.T., A.A.E.W., S.B., U.T.; validation, F.T., A.A.E.W., M.F., P.D., H.R., T.C., S.B., U.T.; formal analysis, F.T., A.A.E.W., S.B., U.T.; investigation, F.T., A.A.E.W., M.F., P.D., H.R., T.C., S.B., U.T.; resources, S.B., U.T.; data curation, F.T., A.A.E.W., M.F., P.D., H.R., T.C., S.B., U.T.; writing—original draft preparation, F.T., A.A.E.W., U.T.; writing—review and editing, F.T., A.A.E.W., M.F., S.B., U.T.; supervision, A.A.E.W., U.T.; project administration, U.T.; funding acquisition, U.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: There is no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are available in the manuscript and the Supplementary Materials.

Acknowledgments: We acknowledge the financial support by the Saxon State Ministry for Social Affairs and Cohesion and the help with the characterization and definition of the soil types by the state—owned enterprise Sachsenforst. We thank Nadja Leinecker, Dana Ruster, Mario Reinhardt and Robert Kuchler for the expert technical support. The authors thank Saxon State Ministry for Social Affairs and Cohesion for collaboration and support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sauter-Louis, C.; Forth, J.H.; Probst, C.; Staubach, C.; Hlinak, A.; Rudovsky, A.; Holland, D.; Schlieben, P.; Goldner, M.; Schatz, J.; et al. Joining the club: First detection of African swine fever in wild boar in Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *68*, 1744–1752. [CrossRef] [PubMed]
2. Friedrich-Loeffler-Institute (FLI). Karten: ASP in Deutschland, 08.01.2021 bis 22.12.2021. Available online: https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00076885 (accessed on 7 January 2022).
3. Friedrich-Loeffler-Institute (FLI). Karten zur Afrikanischen Schweinepest. Available online: <https://www.fli.de/de/aktuelles/tierseuchengeschehen/afrikanische-schweinepest/karten-zur-afrikanischen-schweinepest/> (accessed on 17 September 2021).
4. Forth, J.H.; (Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, Germany). African Swine Fever Virus—Variants on the Rise. Personal communication, 2022. *in press*.
5. European Food Safety Authority (EFSA). Epidemiological Analyses of African Swine Fever in the European Union (November 2018 to October 2019). Available online: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2020.5996> (accessed on 30 January 2020).
6. European Food Safety Authority (EFSA). Epidemiological Analyses of African Swine fever in the European Union (November 2017 until November 2018). Available online: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2018.5494> (accessed on 29 November 2018).
7. Bundesministerium für Gesundheit und Konsumentenschutz GZ 39.505/6-III/A/4b/96. Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei Anzeigepflichtigen Tierseuchen; Durchführungsbestimmungen des Bundesministeriums für Gesundheit und Konsumentenschutz GZ 39.505/6-III/A/4b/96. Available online: https://www.verbraucher-gesundheit.gv.at/tiere/tierseucheneubungen/tierseuchen_desinfektionserlass.pdf?7vj8ky (accessed on 5 March 2021).
8. Kalmar, I.D.; Cay, A.B.; Tignon, M. Sensitivity of African swine fever virus (ASFV) to heat, alkalinity and peroxide treatment in presence or absence of porcine plasma. *Vet. Microbiol.* **2018**, *219*, 144–149. [CrossRef] [PubMed]
9. Mazur-Panasiuk, N.; Zmudzki, J.; Wozniakowski, G. African Swine Fever Virus—Persistence in Different Environmental Conditions and the Possibility of its Indirect Transmission. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 303–310. [CrossRef] [PubMed]
10. Tanneberger, F.; Abd El Wahed, A.; Fischer, M.; Blome, S.; Truyen, U. The efficacy of disinfection on modified vaccinia Ankara and African Swine fever Virus in various forest soil types. *Viruses* **2021**, *14*, 2173. [CrossRef] [PubMed]
11. Alonso, C.; Borca, M.; Dixon, L.; Revilla, Y.; Rodriguez, F.; Escribano, J.M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 613–614. [CrossRef] [PubMed]
12. Friedrich-Loeffler-Institute (FLI). Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen—Peressigsäure. Greifswald—Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst. Available online: https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00025821/FLI-V3-3-6-Chemische-Desinfektionsmittel-Peressigsaeure-RL-Desinfektion-V02-2020-07-30.pdf (accessed on 30 July 2020).
13. European Food Safety Authority (EFSA). Available data on notified biocides efficacy under field conditions. *EFSA J.* **2009**, *2009*, 34.
14. Grabow, W.O.; Middendorff, I.G.; Basson, N.C. Role of lime treatment in the removal of bacteria, enteric viruses, and coliphages in a wastewater reclamation plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *35*, 663–669. [CrossRef] [PubMed]
15. Berg, G. Removal of viruses from sewage, effluents, and waters. I. A review. *Bull. World Health Organ.* **1973**, *49*, 451–460. [PubMed]
16. Matsuzaki, S.; Azuma, K.; Lin, X.; Kuragano, M.; Uwai, K.; Yamanaka, S.; Tokuraku, K. Farm use of calcium hydroxide as an effective barrier against pathogens. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7941. [CrossRef] [PubMed]
17. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG). DVG-Prüfrichtlinien, V. Tierhaltung Viruzidie—Methoden der Prüfung von Chemischen Desinfektionsmitteln für die Tierhaltung. Available online: https://www.desinfektion-d.dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/V4_Viruzidie_7Nov2017.pdf (accessed on 7 November 2017).
18. Location Map Saxony, Germany (Modified for Experimental Background). 2009. Available online: https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Saxony_location_map.svg (accessed on 29 August 2012).
19. Hübner, A.; Keßler, C.; Pannhorst, K.; Forth, J.H.; Kabuuka, T.; Karger, A.; Mettenleiter, T.C.; Fuchs, W. Identification and characterization of the 285L and K145R proteins of African swine fever virus. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 1303–1314. [CrossRef] [PubMed]
20. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V.2 und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von Chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit Gegen Viren in der Humanmedizin Fassung vom 1. August 2008. Available online: <https://www.springermedizin.de/leitlinie1-der-deutschen-vereinigung-zur-bekaempfung-der-viruskr/8010706> (accessed on 1 August 2008).
21. De Lorenzi, G.; Borella, L.; Alborali, G.L.; Prodanov-Radulovic, J.; Stukelj, M.; Bellini, S. African swine fever: A review of cleaning and disinfection procedures in commercial pig holdings. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *132*, 262–267. [CrossRef] [PubMed]
22. Gabbert, L.R.; Neilan, J.G.; Rasmussen, M. Recovery and chemical disinfection of foot-and-mouth disease and African swine fever viruses from porous concrete surfaces. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 1092–1101. [CrossRef] [PubMed]
23. Krug, P.W.; Davis, T.; O'Brien, C.; LaRocco, M.; Rodriguez, L.L. Disinfection of transboundary animal disease viruses on surfaces used in pork packing plants. *Vet. Microbiol.* **2018**, *219*, 219–225. [CrossRef] [PubMed]
24. Krug, P.W.; Lee, L.J.; Eslami, A.C.; Larson, C.R.; Rodriguez, L. Chemical disinfection of high-consequence transboundary animal disease viruses on nonporous surfaces. *Biologicals* **2011**, *39*, 231–235. [CrossRef] [PubMed]

25. Franz, J.; Conraths, K.D.; Probst, C.; Sauter-Louis, C.; Beer, M.; Mettenleiter, T.; Blome, S. Maßnahmen im Falle eines Ausbruchs von ASP bei Wildschweinen. Available online: https://www.bauernverband-mv.de/sites/default/files/2018-03/Vortrag2_Prof._Conr.raths.pdf (accessed on 8 March 2021).
26. Guberti, V.; Khomenko, S.; Masiulis, M.; Kerba, S. African Swine Fever in Wild Boar—Ecology and Biosecurity. In *FAO Animal Production and Health Manual No. 22*; FAO: Rome, Italy, 2019; Available online: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/en-manual-asfinwildboar-2019-web.pdf> (accessed on 19 March 2021).
27. Friedrich-Loeffler-Institute (FLI). *Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen—Grundsätze zu Anforderungen und Anwendungen von Wirkstoffklassen*; Friedrich-Loeffler-Institute: Riems, Germany, 2020.
28. Anon. *Infection Route of the 2007 Outbreak of Highly Pathogenic Avian Influenza in Japan*; Food Safety and Consumer Affairs Bureau Ministry of Agriculture, Forestry & Fisheries: Tokyo, Japan, 2007.
29. Ruenphet, S.; Punyadarsaniya, D.; Jantafong, T.; Takehara, K. Stability and virucidal efficacies using powder and liquid forms of fresh charcoal ash and slaked lime against Newcastle disease virus and Avian influenza virus. *Vet. World* **2019**, *12*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Koch, M.A.; Euler, B. Lime as Disinfectant für Pig Slurry Contaminated with Aujeszky's Disease (Pseudorabies) Virus (ADV). *Agric. Wastes* **1984**, *9*, 289–297. [[CrossRef](#)]
31. Schmitz, A.P.; Le Bouquin, M.S.; Rousset, N.; Ogor, K.; LeBras, M.O.; Martenot, C.; Daniel, P.; Belen Cepeda Hontecillas, A.; Scoizec, A.; Morin, H. Natural and Experimental Persistence of Highly Pathogenic H5 Influenza Viruses in Slurry of Domestic Ducks, with or without Lime Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e02288-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Friedrich-Loeffler-Institute (FLI). *Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen—Kalk*; Friedrich-Loeffler-Institute: Riems, Germany, 2020.
33. Schneider, T.; Strauch, B.R.D. Untersuchungen über den Einsatz von Branntkalk zur Desinfektion von Stallböden. *Tierarztl. Umsch.* **1992**, *47*, 534–538.
34. Tanneberger, F.; Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health. *Survey Experiment on the Change in Soil pH after Disinfection with Lime Products*; data not shown; Leipzig University: Leipzig, Germany, 2021.

4 Diskussion

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) ist eine hochkontagiöse virale Tierseuche, die erhebliches Verbreitungspotential hat und somit eine enorme Bedrohung für die Hausschweinbestände darstellt. Zum aktuellen Zeitpunkt (Februar 2022) sind in Deutschland mehr als 2700 Fälle der ASP beim Wildschwein bekannt, die Dunkelziffer dürfte um ein Vielfaches höher sein. Ausgehend vom enormen Infektionspotential sowie den vornehmlichen Aufenthaltsräumen dieser Tiere, dem Wald, stehen essentielle Fragen zum Thema Tenazität des Virus im Waldboden sowie Desinfektion des Waldbodens im Raum. Obwohl die Tierseuche seit Jahrzehnten bekannt und seit Jahren in vielen europäischen Ländern verbreitet ist, gibt es hierzu bisher nur wenige Studien. Die meisten vorliegenden Studien beziehen sich auf die Tenazität von ASFV in Produkten vom Schwein (Wurst- und Fleischwaren, Blut) (KOVALENKO 1965, PLOWRIGHT 1967, MCKERCHER 1978, MEBUS et al. 1993, PETRINI et al. 2019) oder auf Oberflächen (KRUG et al. 2011, KRUG et al. 2018, GABBERT et al. 2020), jedoch nur wenige auf unbefestigte Erdböden. Hierbei wurden vor allem PCR-Daten bzw. In vivo - Assays erhoben und nur in äußerst geringem Umfang die tatsächliche Quantifizierung der Restinfektiosität des Virus betrachtet.

Ziel dieses Projektes war es, die tatsächliche Stabilität des Virus im Waldboden, sowie die effektive Desinfektion kontaminierten Waldbodens zu untersuchen. Hierbei wurde der Fokus auf sächsische Waldböden gelegt. Im Zuge dieser Arbeit entstand eine Handlungsempfehlung (Anhang 6) für die zuständigen Ämter zur Desinfektion von Erdböden im Fall der ASP.

Inhalte der Publikationen waren die Definition der generellen Tenazität von ASFV in Waldböden verschiedener Charakteristika sowie einer Desinfektionsstudie mit den zur Tierseuchenbekämpfung eingesetzten Desinfektionsmitteln Peressigsäure, Zitronensäure, Löschkalk, Branntkalk und Kalkmilch. Es galt zu klären, ob und wie lange der kontaminierte Erdboden nach Auffinden eines verendeten Wildschweines eine Infektionsquelle für andere Wildschweine darstellt und somit zur Ausbreitung der Krankheit beiträgt. Hierfür wurden sechs verschiedene sächsische Waldböden in Kooperation mit dem Staatsbetrieb Sachsenforst ausgewählt und in erster Instanz eine Tenazitätsstudie in verschiedenen Bodentiefen bzw. -schichten und Inkubationszeiten bis 72 Stunden im ausgewählten Bodenmaterial durchgeführt. Als Carrier wurden mit getrocknetem Virus beladene Stahlkeimträger in unterschiedlicher Erdtiefe vergraben.

Wie sich anhand der Tenazitätsstudie gezeigt hat, liegt eine langfristige Stabilität von MVA und ASFV in jeglichen Arten von Waldböden vor. Nach zwei Stunden Bodenkontakt ist bei beiden Viren ein Titerverlust von 2-3 \log_{10} TCID₅₀ Stufen zu beobachten, jedoch verringert sich die Infektiosität von ASFV auch über drei Tage im Boden nicht weiter. Zwischen den einzelnen Böden waren in keiner der

Versuchsgegebenheiten signifikante Unterschiede in Bezug auf die Virusinaktivierung erkennbar. Dies steht im Gegensatz zu einigen publizierten Studien, in denen es zum Teil deutliche Unterschiede im Inaktivierungsverhalten von ASFV in verschiedenen Bodentypen gibt (CARLSON et al. 2020, MAZUR-PANASIUK and WOZNIAKOWSKI 2020); dies kann anhand der hier erhobenen Versuchsergebnisse nicht bestätigt werden. Dies war zu erwarten, da im Rahmen dieser Studie im Gegensatz zu den erwähnten Studien ausschließlich Waldböden und nicht beliebige Böden unterschiedlicher Umgebungen und Art (Strandsand, kommerziell erhältliche Gartenerde (CARLSON et al. 2020), Laub (MAZUR-PANASIUK and WOZNIAKOWSKI 2020)) untersucht worden sind. Weiterhin ist die Aussagekraft einer Testung von nicht standardisierten bzw. nicht genau charakterisierten Erdböden wie kommerzieller Gartenerde generell als fraglich zu beurteilen.

Die Auswahl der Klasse der Waldböden erfolgte für diese Tenazitäts- und Desinfektionsstudie aufgrund ihrer Signifikanz in Bezug auf die steigenden Ausbruchsgeschehen bzw. Kadaverfunde von Wildschweinen, welche aufgrund ihres hauptsächlichlichen Habitats vor allem in Waldgebieten auftreten (TACK 2018).

Die nachgewiesene, langanhaltende Tenazität von ASFV in den getesteten Böden kann mit dem erhöhten organischen Anteil begründet werden, welcher auch in der Humusschicht von Waldböden vorzufinden ist. Hohe Konzentrationen organischer Komponenten können protektiv auf ASFV wirken (WALES and DAVIES 2021). Besonders Humus beinhaltet eine hohe Konzentration an abgestorbenem organischem Material unterschiedlicher Zersetzungsgrade. Die dort enthaltenen Huminstoffe, insbesondere die Huminsäure, fördern die Aggregation von Viren und wirkt somit besonders protektiv auf die Partikel (BITTON et al. 1984). Dies scheint sowohl für MVA als auch für ASFV in Bezug auf die Stabilität im Erdboden zu gelten. Auf andere Erregerklassen wurde hingegen ein inaktivierender Effekt beobachtet (KUZNETSOVA et al. 2018). Eine zusätzliche Begründung für die nachgewiesene langfristige Tenazität könnte die erhöhte Stabilität von getrocknetem Virus sein. In getrocknetem Blut zeigt sich für ASFV eine erhöhte Stabilität über Monate bis Jahre (KOVALENKO 1965), was so kontaminierte Böden über einen langen Zeitraum zu einer erheblichen Infektionsquelle machen kann. Lediglich bei vergrabenen Kadavern scheint das Virus im Erdboden in direkter Kadaverumgebung durch die stattfindenden Zersetzungsprozesse inaktiviert zu werden (ZANI et al. 2020).

Da im Blut infizierter Tiere besonders hohe Titer von über 10^8 HAD₅₀/ml nachgewiesen werden können (GUINAT et al. 2016, GALLARDO et al. 2017, FISCHER 2020) und die minimale orale Infektionsdosis von hochpathogenen Stämmen je nach aufgenommenem Medium schon zwischen 10^0 HAD₅₀/ml und 10^4 HAD₅₀/ml liegen kann (NIEDERWERDER et al. 2019), ist eine Infektion über kontaminierten Erdboden dennoch wahrscheinlich und auch über einen langen Zeitraum möglich.

Diese Beobachtung der langanhaltenden Tenazität muss strikte und effektive Desinfektionsmaßnahmen nach sich ziehen, da mit ASFV kontaminierte Erdböden ein Infektions- und somit ein erhebliches Verbreitungsrisiko darstellen.

Um in Anbetracht der aktuell befürchteten schnellen Verbreitungssituation effektiv handeln zu können, wurde im Rahmen dieser Studie die direkte Bodendesinfektion ohne Verbringung des kontaminierten Erdreichs untersucht. Diese Methode hat den Vorteil, dass das Kontaminationsrisiko für eventuelle Gerätschaften sowie die Umgebung im Vergleich zur bisher angewandten Methode massiv reduziert werden würde und weitaus schneller zu realisieren wäre. Zur Untersuchung des Verhaltens von ASFV bei der Desinfektion in Verbindung mit Erdböden, folgten somit Studien mit den Mitteln Peressigsäure, Zitronensäure, Löschkalk, Kalkmilch und Branntkalk in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen und in Kombination mit den verschiedenen Test-Waldböden. Die Untersuchungen in dieser Studie erfolgten in Anlehnung an die Suspensionstests der DVG (DVG 2017a) in Kombination mit den bereits in den Tenazitäts-Versuchen genutzten Waldboden-Proben.

Zur Testung von Desinfektionsmitteln gegen Viren erfolgt nach Vorgaben der DVG die Nutzung klar definierter Testviren (DVG 2017b) nach der sogenannten Surrogatmethode. Mit einem geeigneten Surrogatvirus erhobene Ergebnisse können nahtlos auf das Originalvirus übernommen werden. Hier nutzt die DVG beispielsweise das Vacciniavirus (Familie *Poxviridae*) als Surrogat für behüllte DNA-Viren bzw. das Newcastle Disease Virus (NDV, Familie *Paramyxoviridae*) als Surrogat für behüllte RNA-Viren. Demzufolge wurde das apathogene Vacciniavirus Modified Vaccina Ankara (MVA) für die hier durchgeführten Versuche als Ersatz für ASFV ausgewählt.

Die Zuverlässigkeit und Eignung der Surrogatmethode zeigt sich in der bereits jahrelangen Nutzung in der Wissenschaft, da sich viele Erreger nicht zur Kultivierung im Labor eignen bzw. eine signifikante Gesundheitsgefährdung von ihnen ausgeht. Als Surrogat werden hier in aller Regel tierpathogene bzw. apathogene Erreger (wie beispielsweise MVA (MEISINGER-HENSCHEL et al. 2010)) genutzt, die strukturelle Ähnlichkeit zum Ausgangserreger aufweisen. Diese Methode wird beispielsweise für das Hepatitis C Virus (BUCKWOLD et al. 2003) angewandt; als Surrogatvirus wird hierbei gängig das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVD) genutzt. Ebenso gilt seit seiner Entdeckung im Jahr 2003 das Murine Norovirus (MNV) als meistgenutztes Surrogat für das Humane Norovirus (WOBUS et al. 2006).

Die besondere Eignung von MVA als Surrogat für ASFV zeigt sich über die reine Behüllung hinaus in der engen Verwandtschaft beider Viren: ASFV wurde bis zum Jahr 1984 zur Familie der *Iridoviridae* gezählt, bis es zum einzigen Vertreter der Familie der *Asfarviridae* ernannt wurde (ALONSO et al. 2018). Sowohl *Iridoviridae* als auch *Poxviridae* sind Bestandteil der großen Gruppe der *Nucleocytoviricota*, auch

Nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV) genannt (CLAVERIE 2008), da sie sehr ähnliche Replikationsstrategien sowie Ähnlichkeiten im Genom (ALONSO et al. 2018) aufweisen.

Da die Arbeit mit ASFV ein Labor mit Sicherheitsstufe 4 erfordert und Labore im Allgemeinen über eine Sicherheitsstufe 2 bzw. 3 verfügen, ermöglicht die Etablierung eines geeigneten Surrogatvirus wie MVA eine breitgefächerte und gezielte Erforschung verschiedener Fragestellungen zum Ausgangserreger an vielen Forschungsstandorten. Alle durchgeführten Versuche wurden zur abschließenden Verifikation der Eignung von MVA zusätzlich mit ASFV in den Hochsicherheitslaboren des FLI wiederholt.

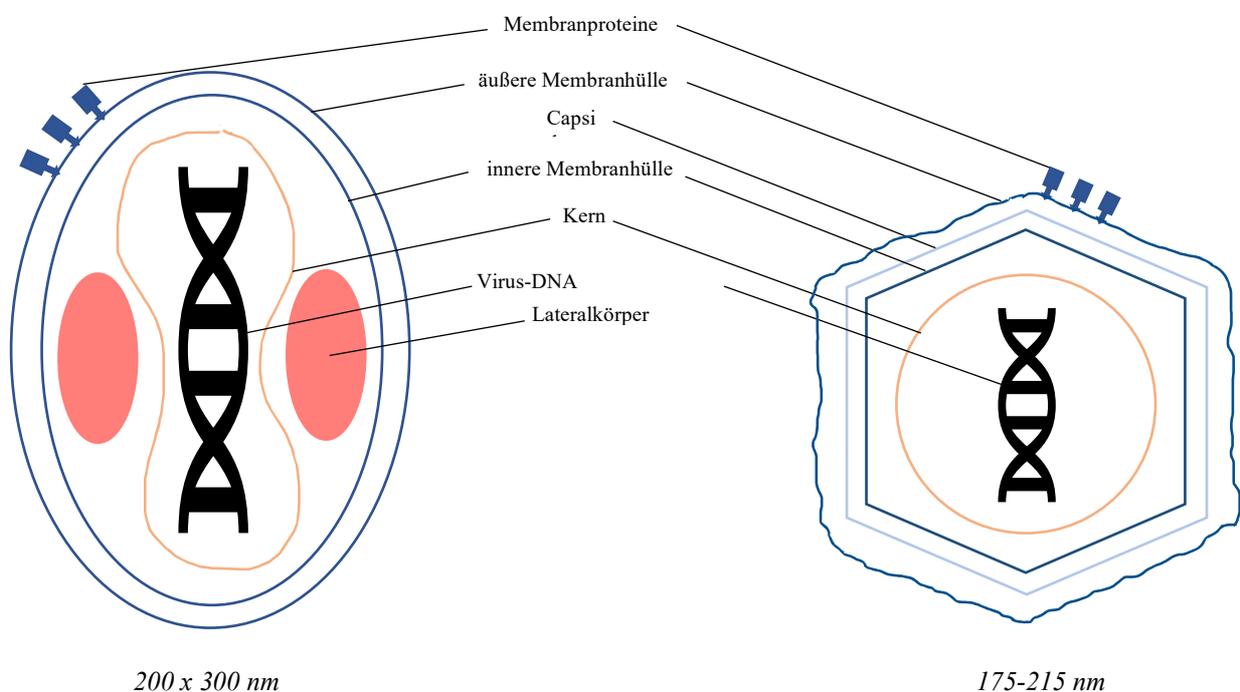


Abb. 6 Aufbau von MVA (links) und ASFV (rechts)

Die Auswahl potentiell geeigneter Desinfektionsmittel für die Versuche erfolgte in Anbetracht ihrer Umweltverträglichkeit sowie ihrer bisherigen Verwendung im Tierseuchenfall.

Um die sauren Effekte der Waldböden (pH 4-6) zu unterstützen, begann die Studie mit den als unbedenklich geltenden Säuren Peressig- und Zitronensäure. Beide Mittel werden zur Desinfektion eingesetzt, beispielsweise in der Desinfektion von Abwässern oder im Lebensmittelbereich (LUUKKONEN et al. 2020, ORTIZ-SOLA et al. 2020).

Auch in der Tierseuchenbekämpfung finden sie Anwendung, wie beispielsweise gegen die Maul- und Klauenseuche (HONG et al. 2015) oder *Bacillus anthracis* (MIZAK 2005).

In dieser Studie war bereits 0,1% Peressigsäure in der Lage, sowohl MVA als auch ASFV in Verbindung mit allen getesteten Waldböden um etwa 3-4 \log_{10} Stufen zu reduzieren, was unter den Versuchsbedingungen einer vollständigen Desinfektionswirkung gleichzusetzen ist (DVG 2017a). Im Gegensatz zeigte Zitronensäure eine nur begrenzte Wirksamkeit auf ASFV, insbesondere in Verbindung mit den stark organischen Humushorizonten der Böden.

Beide Mittel weisen ein ähnliches Wirkprinzip auf; sie destabilisieren die Lipidmembran und denaturieren virale Proteine (JUSZKIEWICZ et al. 2019a, FLI 2020e, 2020h). Die betrachteten Waldböden weisen pH-Werte zwischen 4 und 5,5 auf, was als alleiniges Inaktivierungskriterium für die Viren nicht ausreichend ist. Erst ein längerfristiger pH-Wert von 3 oder weniger und in Abhängigkeit von der Proteinbelastung kann MVA bzw. ASFV effizient inaktivieren (HALE 1942, PLOWRIGHT 1967, JUSZKIEWICZ et al. 2019b). Dieses stark saure Milieu ist vor allem für die sichere Wirkungsweise von Zitronensäure notwendig, während Peressigsäure einen größeren Wirkungsspielraum in Bezug auf den pH-Wert der Umgebung aufweist. Dies könnte die besseren Inaktivierungserfolge von Peressigsäure in dieser Studie erklären.

Obwohl der Sauerstoffabspalter bekanntermaßen in Verbindung mit organischen Materialien wie Blut (VON RHEINBABEN and WERNER 2014) einen großen Teil seiner Desinfektionswirkung einbüßt und auch von einem geringgradigen Temperaturfehler berichtet wurde (FLI 2020h), konnte weder die experimentelle hohe Proteinbelastung von 40% FKS, noch die niedrige Versuchstemperatur von 10°C (Vorgabe der DVG zur Testung von Desinfektionsmitteln und nah an der sächsischen Jahresdurchschnittstemperatur) die Wirksamkeit von Peressigsäure beeinflussen. Somit weist dieses Mittel eine gute Eignung für den realen Feldeinsatz auf. Dies trifft nicht auf Zitronensäure zu, welche weiterhin sowohl durch die hohe Proteinbelastung (Eiweißfehler) als auch durch die geringe Versuchstemperatur (Temperaturfehler) in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt wird (FLI 2020e).

Die bereits erwähnte Umweltverträglichkeit trifft trotz ihrer starken Wirksamkeit auf Peressigsäure zu, da sie bereits nach wenigen Stunden in Essigsäure, Sauerstoff und Wasser zerfällt (FAUSER-LEIENSETTER 2000). Aufgrund dieser Eigenschaften weist dieser Wirkstoff auch in großen Mengen nur äußerst geringes Umweltschädigungspotential auf. Da Wälder und besonders Waldböden empfindliche Ökosysteme darstellen, ist deren Erhaltung trotz Desinfektionsmaßnahmen von oberster Priorität und verlangt ausschließlich nach entsprechend getesteten, verträglichen Mitteln. Demzufolge muss auch das minimal zur Bodenbenetzung

notwendige Desinfektionsvolumen genau festgelegt und befolgt werden, um eine unnötige Belastung der Bodenstrukturen zu vermeiden.

Die noch in der alten Desinfektionsrichtlinie empfohlene Menge von mindestens 5l/m² zur Desinfektion von unbefestigten Böden (ANON. 2007b) ist das tatsächlich notwendige Flüssigkeitsvolumen, um Böden vollständig zu benetzen und eine sichere Desinfektionswirkung zu erzielen. Die sichere Desinfektionswirkung erfolgt bis zu einer Tiefe von ca. 0,5 cm. Weiterhin muss für eine Desinfektion bis 5 cm Tiefe ein Desinfektionsvolumen von mehr als 10l/m² ausgebracht werden, was gegen das Konzept der Umweltverträglichkeit stehen würde. Dies konnten wir im Vorfeld anhand überblickender Volumenversuche bestätigen. In Anbetracht der realen Situation an Kadaverfundorten, ist die sichere Durchtränkung von 0,5 cm Erdbodentiefe als effektive und ausreichende Desinfektionsmaßnahme zu bewerten.

Da zuvor getestete Desinfektionsmittel insbesondere in Verbindung mit Verwesungsflüssigkeit bzw. Blut unter Vorbehalt (Peressigsäure) bzw. nicht (Zitronensäure) zur Desinfektion von ASFV empfohlen werden können, mussten weitere Desinfektionsmittel in Betracht gezogen werden. Weiterhin spielt die einfache Transportierbarkeit bzw. Applizierbarkeit im Fall größerer Ausbruchsgeschehen eine wichtige Rolle. Aus dieser Überlegung ergab sich die Wirkstoffklasse des Kalks, welcher durch seinen pulvrigen Charakter auch in größeren Mengen und über weite Strecken durch Einzelpersonen in Wälder verbracht und ausgebracht werden kann. Dieser wird in den Ausführungen Löschkalk, Branntkalk und Kalkmilch im Tierseuchenfall eingesetzt, u.a. in ebenfalls empfindlichen Ökosystemen wie Teichen (BERG 1973). Die bisherigen Empfehlungen bewegten sich bisher im Bereich bis 40% Kalkmilch (HAAS 1995) bzw. dem Verhältnis von 1 kg Branntkalk auf 1,5 l Wasser zur Flächendesinfektion von einem Quadratmeter Bodenfläche (FLI 2020b) oder sogar bis zu einer Tiefe von 10 cm mit 3,2 kg Branntkalk je Quadratmeter (WASIAK 2009).

Für alle getesteten Kalkprodukte und beide Viren weisen 10% Wirkkonzentration im Suspensionstest im Rahmen dieser Studie eine Titerreduktion von mindesten 4 log₁₀ Stufen und somit ein sicheres Desinfektionsergebnis auf. Besonders überraschend war hierbei die gleichsame Wirksamkeit von Löschkalk und Branntkalk sowie der Unabhängigkeit vom Wasserzusatz im Verhältnis zwischen 0 bis 1:9, obwohl laut SCHNEIDER (1992) ein zu geringer oder zu hoher Wassereinsatz die Wirksamkeit der Kalkprodukte hemmen kann.

Weiterhin gab es keine Unterschiede in der Effektivität zwischen den beiden Viren bzw. zwischen den unterschiedlichen Böden sowie keinerlei Abschwächung durch den hohen zugesetzten Proteinanteil. Auch die erwartete Neutralisation der Desinfektionswirkung zwischen den sauren Waldböden und den alkalischen Kalkprodukten blieb aus. Diese Erkenntnisse machen Kalk zu einem idealen

Desinfektionsmittel für unbefestigte Böden im Kampf gegen die ASP. Lediglich die Anwendung des exotherm reagierenden Branntkalks muss in Bezug auf eine potentiell bestehende Waldbrandgefahr kritisch betrachtet werden.

Obwohl die Desinfektionswirkung in vielen verschiedenen Böden erhoben worden ist, fielen so gut wie keine Unterschiede im generellen Desinfektionsverhalten auf. Die geringgradigen Abweichungen sind insgesamt auf die Sickerungseigenschaften der einzelnen Böden zurückzuführen, welche maßgeblich vom Feuchtigkeitsgehalt der Bodensubstanz abhängt. Die Bodenfeuchtigkeit der beprobten Waldböden war aufgrund der erheblichen Niederschlagsarmut im Zeitraum der Probenentnahme (April 2020) als gering einzustufen (ANON. 2020). Um einer Verdünnung durch höhere Bodenwassergehalte bei niederschlagsreichen Witterungsperioden oder einem Wirkungsverlust durch Interaktion mit anderen Substanzen vorzubeugen, fiel die tatsächliche Desinfektionsempfehlung daher für alle getesteten Mittel für ASFV um eine Konzentrationsstufe höher aus. Zusätzlich muss trotz der erfolgten Versuche mit hoher Proteinbelastung von 40% die deutlich komplexere Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten sowie der starke Einfluss auf die Desinfektionswirkung bedacht werden, was eine Konzentrationsanpassung abermals sinnvoll macht. Weiterhin berücksichtigt man mit dieser Anpassung ebenso die potentiell lokal variierenden Bodenzusammensetzungen. Es muss jedoch bedacht werden, dass sich die hier empfohlenen Desinfektionsmodalitäten auf die ausgewählten und getesteten sächsischen Bodentypen beziehen. Aufgrund der Vielfältigkeit der weltweiten Bodenstrukturen sowie der riesigen Spannweite der jeweiligen Parameter, ist eine zusätzliche Testung an weiteren Bodentypen verschiedener Länder als sinnvoll zu erachten.

Generell stellt sich insbesondere in den afrikanischen Nationen, in denen nicht wildlebende Schweinearten per se, sondern die Zeckengattung *Ornithodoros* als Hauptüberträger des Virus gilt (WILKINSON 1984, COSTARD et al. 2013), die Frage der generellen Sinnhaftigkeit einer solch aufwändigen Desinfektion unbefestigter Erdböden. Eine entsprechende Bodendesinfektion wird sicher auch hier sinnvoll sein, jedoch bei weitem keine so tragende Rolle in der Unterbrechung von Übertragungswegen wie in den europäischen Staaten spielen. Die ausgedehnte Reduktion der lokalen indirekten Carriertiere (Warzen- und Buschschweine) sowie die flächendeckende antiparasitäre Behandlung der Hausschweinbestände stellt hier im Vergleich zur Erdbodendesinfektion eine deutlich effizientere Bekämpfungsstrategie dar. Für den außerafrikanischen Raum ist die Methode der direkten Erdbodendesinfektion jedoch als effektives Mittel der Wahl zur Bekämpfung der ASP anzusehen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die getesteten Viren und vor allem ASFV eine erhebliche Stabilität in Erdböden zeigt und diesen bei Kontamination zu

einer realen und nicht zu unterschätzenden Infektionsquelle macht. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführte direkte Bodendesinfektion stellt eine deutlich einfachere und sicherere Lösung zur Dekontamination von Erdböden dar, als die bisher empfohlenen Methoden.

Aufgrund der ausgewählten Testböden und erhobenen Ergebnisse können zur Desinfektion von sächsischen Waldböden die Desinfektionsmittel Peressigsäure sowie vor allem Kalk zur sicheren ASFV-Dekontamination empfohlen werden. Wegen der sich aktuell zuspitzenden Infektionslage in Sachsen, haben sich die hiermit durchgeführten Forschungen auf sächsische Waldböden konzentriert. Da Erdböden weltweit sehr variabel sein können und auch verschiedene Wechselwirkungen zwischen Kontaminanten, Mitteln und Böden auftreten können, ist eine tiefergehende Erforschung der direkten Bodendesinfektion in verschiedenen Ländern und Standorten und unter verschiedensten Witterungsbedingungen angebracht.

Beim aktuellen ASP-Ausbreitungsgeschehen im Landkreis Meißen (Sachsen) (ANON. 2021d) konnte so bereits die kadaverbedingte zielgerichtete Desinfektion einer der beprobten Bodenfläche erfolgen. Weiterhin zeigen die sehr ähnlichen Ergebnisse, dass sich MVA als Surrogatvirus für ASFV eignet, was weiterführende Forschungen auf diesem Gebiet deutlich erleichtern und beschleunigen kann. Somit kann die hier durchgeführte Arbeit als ein wichtiger Beitrag zur Tierseuchenbekämpfung über die reine Grundlagenforschung hinaus angesehen werden.

5 Zusammenfassung

Franziska Tanneberger

Tenazität und Desinfektion des Virus der Afrikanischen Schweinepest im Waldboden

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Februar 2022

53 Seiten, 6 Abbildungen, 2 Tabellen, 125 Literaturangaben, 2 Publikationen, 6 Anhänge

Schlüsselwörter: Afrikanische Schweinepest, Modified Vaccinia Ankara, Tenazität, Desinfektion, Zitronensäure, Peressigsäure, Kalk

Einleitung

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) ist eine hochkontagiöse Tierseuche, die ausschließlich Schweine befällt. Im September 2020 wurde sie erstmals in den deutschen Wildschweinbeständen nachgewiesen und hat sich im Oktober 2021 bis in die ersten nationalen Hausschweinbestände ausgebreitet. Das Wildschwein gilt im europäischen Raum als Carrier für das Virus, sodass infektiöse Kadaver entsorgt sowie kontaminierte Bodenflächen zielgerichtet desinfiziert werden müssen. Aufgrund der allgemeinen Lebensräume dieser Tiere, ist hier vor allem die Desinfektion von unbefestigten (Wald-) Böden zur Verbreitungsprävention relevant.

Ziel der Untersuchungen

ASP ist eine gefürchtete Tierseuche, die vom Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASFV) ausgelöst wird. Das Ziel dieser Studie war die Ergründung des tatsächlichen Infektionspotentials ASFV-kontaminierter Waldböden. Ein weiteres Ziel war die hieraus folgende notwendige direkte Desinfektion betroffener Waldböden und die Effizienztestung diverser umweltfreundlicher Desinfektionsmittel.

Material und Methoden

ASFV sowie das geeignete Surrogatvirus Modified Vaccinia Ankara (MVA) wurden in Bezug auf ihre Tenazität in sechs verschiedenen sächsischen Waldböden in zwei unterschiedlichen Erdtiefen und -schichten bis zu einer Zeit von drei Tagen untersucht. Die Experimente erfolgten in Anlehnung an das Keimträgermodell der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG). Anschließend wurde die Desinfektion beider Viren in Verbindung mit den sechs Waldböden durchgeführt. Hierbei wurden die Mittel Peressigsäure, Zitronensäure, Löschkalk, Branntkalk und Kalkmilch zur Desinfektion ausgewählt und anhand eines Suspensionstests (DVG) mit den Waldböden getestet. Im Anschluss an die Versuche erfolgte jeweils die Bestimmung der Restinfektiösität durch Kultivierung auf Zellkultur sowie die Ermittlung des noch Vorhandenseins der Viruspartikel mittels qPCR. Alle Versuche erfolgten mindestens im Doppelsatz und wurden mindestens einmal wiederholt.

Ergebnisse

Beide Viren zeigten bereits nach zwei Stunden einen Titereinbruch von 2-3 log Stufen unabhängig von Erdtiefe und Erdtyp. Lediglich bei MVA erfolgte eine weitere stetige Titerreduktion über drei Tage. Peressigsäure zeigte in Verbindung mit Erde eine sehr gute Wirksamkeit im Bereich von 0,1% in Bezug auf beide Viren, wobei 1% Zitronensäure lediglich bei MVA zufriedenstellende Ergebnisse erzielte. Vor allem die stark organischen Humusböden sowie die niedrige Versuchstemperatur schränken die Wirksamkeit von Zitronensäure ein. Für alle drei Kalksorten sind 10% Wirkkonzentration ausreichend, um eine vollständige Reduktion beider Viren unter die Nachweisgrenze zu bewirken. Ebenso erfolgt keine Beeinflussung der Kalkwirkung durch Wasserzugabe bis zu einem Verhältnis von 1:9.

Schlussfolgerungen

Sowohl ASFV als auch MVA zeigen eine langanhaltende Tenazität in allen getesteten Waldböden, was diesen zu einer erheblichen Infektionsquelle macht. Eine sichere Desinfektion mit geeigneten Mitteln muss dringend erfolgen, um eine Verbreitung des Erregers über kontaminiertes Erdreich zu verhindern. Hierfür eignen sich insbesondere Kalk und Peressigsäure.

6 Summary

Franziska Tanneberger

Tenacity and disinfection of the African Swine Fever Virus in forest soil

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in February 2022

53 pages, 6 figures, 2 tables, 125 references, 2 publications, 6 appendices

Keywords: African Swine Fever, Modified Vaccinia Ankara, tenacity, disinfection, citric acid, peracetic acid, lime

Introduction

African swine fever (ASF) is a highly contagious animal disease that exclusively affects pigs. It was first detected in German wild boar population in September 2020 and spread to the first national domestic pig herds in October 2021. The wild boar is considered a carrier for the virus in the European region, so infectious carcasses must be safely disposed and contaminated ground surfaces must be disinfected in a targeted manner. Due to the general habitats of these animals, the disinfection of forest soil is particularly relevant to prevent the spread of the virus.

Aims of the study

ASF is a dreading animal disease caused by the African swine fever virus (ASFV). The aim of this study was to determine the actual contamination potential of ASFV to forest soil. Another objective was to address a possible need for direct disinfection of affected forest soils and the testing of the efficiency of various environmentally friendly disinfectants.

Material and methods

ASFV and the suitable surrogate virus Modified Vaccinia Ankara (MVA) were investigated with regard to their tenacity in six different forest soils from Saxony in two different soil depths and layers up to an exposure time of three days. The experiments were carried out following the germ carrier model of the German Veterinary Society (DVG). Subsequently, the disinfection of both viruses was carried out in the six forest soils. Peracetic acid, citric acid, slaked lime, quicklime and milk of lime were selected for disinfection and tested with the forest soils using a modified suspension test (DVG). After each test, the residual infectivity was determined in cell culture and by qPCR. All tests were carried out at least in duplicates and were repeated at least once.

Results

Both viruses showed a loss of titer of 2-3 log levels already after two hours, independent of soil depth and soil type. Only MVA showed a further steady titer reduction over three days. Peracetic acid in combination with soil showed very good efficacy in the range of 0.1% for both viruses, whereas 1% citric acid gave satisfactory results only with MVA. Mainly the highly organic humus soils as well as the low experimental temperature limited the efficacy of citric acid. For all three lime types, 10% effective concentration is sufficient to cause complete reduction of both viruses below the detection limit. Likewise, there is no influence on the lime effect by adding water up to a ratio of 1:9.

Conclusions

Both ASFV and MVA show long-lasting tenacity in all tested forest soils, making it a significant source of infection. Safe disinfection with suitable products is urgently needed to prevent spread of the pathogen *via* contaminated soil. This study clearly showed that lime and peracetic acid are particularly suitable for this purpose.

7 Referenzen

DVG. Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. DVrG e.V. Gießen. 2000. 3. Auflage.

DVG. DVG-Prüfrichtlinien, V. Tierhaltung Viruzidie - METHODEN DER PRÜFUNG VON CHEMISCHEN DESINFEKTIONSMITTELN FÜR DIE TIERHALTUNG. 2017a.

https://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/V.4_Viruzidie_7Nov2017.pdf. Retrieved on 07.11.2017.

DVG. Anforderungstabelle Prüfrichtlinien Tierhaltung. 2017b. https://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/Anforderungstabelle_DVG-TH-TP_7Nov2017.pdf. Retrieved on 07.11.2017.

EFSA. Scientific Opinion on African swine fever. EFSA Journal 2014. 2014a.

EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of peroxyacetic acid solutions for reduction of pathogens on poultry carcasses and meat. EFSA Journal 2014. 2014b: 60.

EPA. Pesticide Registration - Citric acid. 1992.

https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_G-23_1-Jun-92.pdf. Retrieved on 21.11.2021.

EU. DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2021/605 DER KOMMISSION vom 7. April 2021 mit besonderen Maßnahmen zur Bekämpfung der Afrikanischen Schweinepest. E Union. 2021.

FLI. Empfehlungen des Friedrich-Loeffler-Instituts über Mittel und Verfahren für die Durchführung einer tierseuchenrechtlich vorgeschriebenen Desinfektion. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2019.

FLI. Empfehlungen des FLI zur Desinfektion bei Tierseuchen - Kurznachricht. 2020a. <https://www.fli.de/de/aktuelles/kurznachrichten/neues-einzelansicht/empfehlungen-des-fli-zur-desinfektion-bei-tierseuchen/>. Retrieved on 09.01.2020.

FLI. Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen - Kalk. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2020b.

FLI. Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen - Desinfektion von unbefestigten und befestigten Stallböden, Ausläufen, Plätzen und Zufahrtswegen. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2020c.

FLI. Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen - Afrikanische Schweinepest. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2020d.

FLI. Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen - Ameisensäure, Zitronensäure und andere organische Säuren. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2020e.

FLI. Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen - Chemische Desinfektion in flüssiger Form (Scheuer-, Sprüh- und Tauchverfahren). Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2020f.

FLI. Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen - Desinfektion von unbefestigten und befestigten Stallböden, Ausläufen, Plätzen und Zufahrtswegen. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2020g.

FLI. Empfehlungen zur Desinfektion bei Tierseuchen - Peressigsäure. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2020h.

FLI. Karten zur Afrikanischen Schweinepest. 2021a.

<https://www.fli.de/de/aktuelles/tierseuchengeschehen/afrikanische-schweinepest/karten-zur-afrikanischen-schweinepest/>. Retrieved on 19.11.21.

FLI. Amtliche Methoden und Falldefinition - Afrikanische Schweinepest. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.; 2021b.

OIE. African Swine Fever. 2018. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/african-swine-fever/>. Retrieved on 03.10.2021.

OIE. African Swine Fever (Infection with African Swine Fever Virus). OIE Terrestrial Manual 2019. 2019.

Alonso C, M Borca, L Dixon, Y Revilla, F Rodriguez, JM Escribano and C Ictv Report. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. J Gen Virol. 2018; 99(5): 613-614.

Anon. Schweinepest-Verordnung (SchwPestV, 03.08.1988) in der Fassung der Bekanntmachung vom 8. Juli 2020 (BGBl. I S. 1605), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 6. November 2020 (BANz AT 09.11.2020 V1) geändert worden ist. 1988.

Anon. Schweinehaltungshygieneverordnung (SchHaltHygV, 07.06.1999) in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. April 2014 (BGBl. I S. 326), die zuletzt durch Artikel 134 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist. 1999.

Anon. Infection Route of the 2007 Outbreak of Highly Pathogenic Avian Influenza in Japan. T Investigation Team on the Infection Route of Highly Pathogenic Avian Influenza, Japan, Food Safety and Consumer Affairs Bureau Ministry of Agriculture, Forestry & Fisheries, Tokyo, Japan. 2007a.

Anon. Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMEL) über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen. LuVB Bundesministerium für Ernährung, Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. 2007b.

Anon. Formaldehyde. National Pollutant Inventory; Department of Agriculture, Water and Environment, Australian Government. 2009.

- Anon. Material Safety Data Sheet - Quicklime. Fort Worth, USA, Lhoist North America. 2012.
- Anon. Prävention chemischer Risiken beim Umgang mit Desinfektionsmitteln im Gesundheitswesen - Gefahren chemischer Desinfektionsmittel. Hamburg, Deutschland, Internationale Vereinigung für soziale Sicherheit, Sektion für Arbeitsschutz im Gesundheitswesen. 2014.
- Anon. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products - Assessment Report - Hydrated Lime. European Chemical Agency. 2016a.
- Anon. Forstliche Standortaufnahme. Begriffe, Definitionen, Einteilungen, Kennzeichnungen, Erläuterungen. ASidA Forsteinrichtung. Eching, HW-Verlag; 2016b. 7.
- Anon. Sicherheitsdatenblatt - Natriumhypochlorit. Wuppertal, Deutschland, Bergchemie J.C.Bröcking & Co. GmbH. 2018.
- Anon. Monats- und Jahreszeitenbericht Deutschland - April 2020. D Wetterdienst. Deutscher Wetterdienst. 2020.
- Anon. Sicherheitsdatenblatt - Natriumdodecylsulfat. Hilden, Deutschland, Caesar & Loretz GmbH. 2021a.
- Anon. Sicherheitsdatenblatt - Glutaraldehyd. Einhausen, Deutschland, NeoFroxx GmbH. 2021b.
- Anon. Sicherheitsdatenblatt - Natriumhydroxid. Grafschaft-Ringen, Deutschland, Wittig Umweltchemie GmbH. 2021c.
- Anon. Afrikanische Schweinepest im Landkreis Meißen - Wichtige Informationen. 2021d. <https://www.kreis-meissen.org/14610.html>. Retrieved on 20.11.2021.
- Berg G. Removal of viruses from sewage, effluents, and waters. I. A review. Bull World Health Organ. 1973; 49(5): 451-460.
- Bergdorf V. Virologische Untersuchung über die Eignung der Düngerpackung gem. §14 No. 1 der Anlage A-BA VG zur Desinfektion von Festmist [Dissertation med. vet.]. Universität Hohenheim. 1989.
- Bitton G, OC Pancorbo and SR Farrah. Virus transport and survival after land application of sewage sludge. Appl Environ Microbiol. 1984; 47(5): 905-909.
- Blome S, C Gabriel and M Beer. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. Virus Res. 2013; 173(1): 122-130.
- Böhm R. Organische Säuren als Desinfektionsmittel. Fleischwirtschaft. 1986; 66: 976-979.
- Boinas FS, AJ Wilson, GH Hutchings, C Martins and LJ Dixon. The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. PLoS One. 2011; 6(5): e20383.

Britzius E, Bohm, R. Experimentelle Untersuchungen über den Einsatz von Peressigsäure zur Desinfektion von Schweinegülle. WTM/Veterinary Medicine Austria. 1981.

Buckwold VE, BE Beer and RO Donis. Bovine viral diarrhoea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. Antiviral Res. 2003; 60(1): 1-15.

Carlson J, M Fischer, L Zani, M Eschbaumer, W Fuchs, T Mettenleiter, M Beer and S Blome. Stability of African Swine Fever Virus in Soil and Options to Mitigate the Potential Transmission Risk. Pathogens. 2020; 9(11): 977.

Ceruti A, RM Kobiakka, J Ssekitoleko, JB Okuni, S Blome, A Abd El Wahed and U Truyen. Rapid Extraction and Detection of African Swine Fever Virus DNA Based on Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Assay. Viruses. 2021; 13(9): 1731.

Chapman DAG, V Tcherepanov, C Upton and LK Dixon. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. J Gen Virol. 2008; 89(Pt 2): 397-408.

Claeys H and J-F Heymans. Self-declaration of Belgium's African swine fever-free status in all swine species. OIE. 2020. 32.

Claverie J-M. Mimivirus. Encyclopedia of Virology (Third Edition). BWJ Mahy and MHVV Regenmortel. Amsterdam, Elsevier; 2008: 311-319.

Commission ADNSotE (Animal Disease Notification System of the European commission). ASP in Germany since September 2020. Friedrich-Loeffler-Institute. 2021.

Costard S, L Mur, J Lubroth, JM Sanchez-Vizcaino and DU Pfeiffer. Epidemiology of African swine fever virus. Virus Res. 2013; 173(1): 191-197.

Costard S, B Wieland, W de Glanville, F Jori, R Rowlands, W Vosloo, F Roger, DU Pfeiffer and LK Dixon. African swine fever: how can global spread be prevented? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009; 364(1530): 2683-2696.

Davies K, LC Goatley, C Guinat, CL Netherton, S Gubbins, LK Dixon and AL Reis. Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate. Transbound Emerg Dis. 2017; 64(2): 425-431.

de Villiers EP, C Gallardo, M Arias, M da Silva, C Upton, R Martin and RP Bishop. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. Virology. 2010; 400(1): 128-136.

Dixon LK, DA Chapman, CL Netherton and C Upton. African swine fever virus replication and genomics. Virus Res. 2013; 173(1): 3-14.

Fausser-Leiensegger. Verhalten und Desinfektion der Erreger der Europäischen und Afrikanischen Schweinepest sowie der Maul-und Klauenseuche in Flüssigmist [Dissertation med. vet.] Justus-Liebig-Universität Gießen. 2000.

Fiori MS, D Sanna, F Scarpa, M Floris, A Di Nardo, L Ferretti, F Loi, S Cappai, AM Sechi, PP Angioi, S Zinellu, R Sirica, E Evangelista, M Casu, G Franzoni, A Oggiano and S Dei Giudici. A Deeper Insight into Evolutionary Patterns and Phylogenetic History of ASFV Epidemics in Sardinia (Italy) through Extensive Genomic Sequencing. *Viruses*. 2021; 13(10): 1994.

Fischer M, Hühr, J., Blome, S., Conraths, F. J., Probst, C. Stability of African Swine Fever Virus in Carcasses of Domestic Pigs and Wild Boar Experimentally Infected with the ASFV “Estonia 2014” Isolate. *MDPI Viruses*. 2020; 12(10): 1118.

Gabbert LR, JG Neilan and M Rasmussen. Recovery and chemical disinfection of foot-and-mouth disease and African swine fever viruses from porous concrete surfaces. *J Appl Microbiol*. 2020; 129(5): 1092-1101.

Gabriel C, S Blome, A Malogolovkin, S Parilov, D Kolbasov, JP Teifke and M Beer. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(12): 2342-2345.

Gallardo C, A Soler, R Nieto, C Cano, V Pelayo, MA Sanchez, G Pridotkas, J Fernandez-Pinero, V Briones and M Arias. Experimental Infection of Domestic Pigs with African Swine Fever Virus Lithuania 2014 Genotype II Field Isolate. *Transbound Emerg Dis*. 2017; 64(1): 300-304.

Gaudreault NN, DW Madden, WC Wilson, JD Trujillo and JA Richt. African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. *Front Vet Sci*. 2020; 7: 215.

Gogin A, V Gerasimov, A Malogolovkin and D Kolbasov. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res*. 2013; 173(1): 198-203.

Gomez-Villamandos JC, 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. African swine fever and classical swine fever: a review of the pathogenesis. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2003; 110: 165-169.

Guinat C, S Gubbins, T Vergne, JL Gonzales, L Dixon and DU Pfeiffer. Experimental pig-to-pig transmission dynamics for African swine fever virus, Georgia 2007/1 strain. *Epidemiol Infect*. 2016; 144(1): 25-34.

Haas B, Bohm, R., Strauch, D. Inactivation of viruses in liquid manure. *Revue Scientifique et Technique*. 1995; 14: 435-445.

Hale JM. A Study of the pH Stability of Vaccinia Virus. *Yale J Biol Med*. 1942; 15(2): 241-258.

Hong JK, KN Lee, SH You, SM Kim, D Tark, HS Lee, YJ Ko, MG Seo, JH Park and B Kim. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by citric acid and sodium carbonate with deicers. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81(21): 7610-7614.

Jentsch G. Pharmazie, Pharmakologie der Desinfektionswirkstoffe, 9. Wirkstoffgruppe: Perverbindungen. *Hyg.und Med*. 1978; 3: 125-127.

Juszkiewicz M, M Walczak, N Mazur-Panasiuk and G Wozniakowski. Virucidal effect of chosen disinfectants against African swine fever virus (ASFV) - preliminary studies. *Pol J Vet Sci.* 2019a; 22(4): 777-780.

Juszkiewicz M, M Walczak and G Wozniakowski. Characteristics of Selected Active Substances used in Disinfectants and their Virucidal Activity Against ASFV. *J Vet Res.* 2019b; 63(1): 17-25.

Karalova EM, GA Arzumanian, OS Zakarian, GE Voskanian, V Sarkisian Kh and ZA Karalian. [Dynamics of changes in the composition of leukocyte population of peripheral blood during the African swine fever]. *Vopr Virusol.* 2012; 57(4): 27-31.

Kleiboeker SB. Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2002; 18(3): 431-451.

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

Koch M.A. EB. Lime as Disinfectant für Pig Slurry Contaminated with Aujeszky's Disease (Pseudorabies) Virus (ADV). *Agricultural Wastes.* 1984; 9: 289-297.

Kovalenko JR, Sidorov, M.A., Burba, L.G. Afrikanskaia chuma svinei/ African swine fever. unveröffentlichtes Manuskript; übersetzt ins Deutsche. 1965.

Krug PW, T Davis, C O'Brien, M LaRocco and LL Rodriguez. Disinfection of transboundary animal disease viruses on surfaces used in pork packing plants. *Vet Microbiol.* 2018; 219: 219-225.

Krug PW, CR Larson, AC Eslami and LL Rodriguez. Disinfection of foot-and-mouth disease and African swine fever viruses with citric acid and sodium hypochlorite on birch wood carriers. *Vet Microbiol.* 2012; 156(1-2): 96-101.

Krug PW, LJ Lee, AC Eslami, CR Larson and L Rodriguez. Chemical disinfection of high-consequence transboundary animal disease viruses on nonporous surfaces. *Biologicals.* 2011; 39(4): 231-235.

Kuznetsova A, C Cullingham, D McKenzie and JM Aiken. Soil humic acids degrade CWD prions and reduce infectivity. *PLoS Pathog.* 2018; 14(11): e1007414.

Luukkonen T, H Prokkola and SO Pehkonen. Peracetic acid for conditioning of municipal wastewater sludge: Hygienization, odor control, and fertilizing properties. *Waste Manag.* 2020; 102: 371-379.

Maris P. Modes of action of disinfectants. *OIE Revue Scientifique et Technique.* 1995; 14: 47-55.

Mazur-Panasiuk N and G Wozniakowski. Natural inactivation of African swine fever virus in tissues: Influence of temperature and environmental conditions on virus survival. *Vet Microbiol.* 2020; 242: 108609.

McKercher PD, Hess, Hamdy, F. . Residual viruses in pork products. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978; 35: 145.

Mebus CA, C House, FR Gonzalvo, JM Pineda, J Tapiador, JJ Pire, J Bergada, RJ Yedloutschnig, S Sahu, V Becerra and e al. Survival of foot-and-mouth disease, African swine fever, and hog cholera viruses in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulders and loins. *Food Microbiology*. 1993; 10(2): 133-143.

Meisinger-Henschel C, M Spath, S Lukassen, M Wolferstatter, H Kachelriess, K Baur, U Dirmeier, M Wagner, P Chaplin, M Suter and J Hausmann. Introduction of the six major genomic deletions of modified vaccinia virus Ankara (MVA) into the parental vaccinia virus is not sufficient to reproduce an MVA-like phenotype in cell culture and in mice. *J Virol*. 2010; 84(19): 9907-9919.

Mizak L. [Sporicidal activity of hydrogen peroxide and peracetic acid against *Bacillus anthracis* spores]. *Med Dosw Mikrobiol*. 2005; 57(4): 437-442.

Montgomery RE. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1921; 34: 159-191.

Müller W, Schlenker, G. *Kompendium der Tierhygiene*. Berlin, Lehmanns Media; 2004

Niederwerder MC, AMM Stoian, RRR Rowland, SS Dritz, V Petrovan, LA Constance, JT Gebhardt, M Olcha, CK Jones, JC Woodworth, Y Fang, J Liang and TJ Hefley. Infectious Dose of African Swine Fever Virus When Consumed Naturally in Liquid or Feed. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25(5): 891-897.

Niethammer J and F Krapp. *Handbuch der Säugetiere Europas*. Band 2/II Paarhufer – Artiodactyla. Wiesbaden, Aula Verlag; 1986

Olesen AS, L Lohse, A Boklund, T Halasa, GJ Belsham, TB Rasmussen and A Botner. Short time window for transmissibility of African swine fever virus from a contaminated environment. *Transbound Emerg Dis*. 2018; 65(4): 1024-1032.

Ortiz-Sola J, M Abadias, P Colas-Meda, G Sanchez, G Bobo and I Vinas. Evaluation of a sanitizing washing step with different chemical disinfectants for the strawberry processing industry. *Int J Food Microbiol*. 2020; 334: 108810.

Oura CA, PP Powell, E Anderson and RM Parkhouse. The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J Gen Virol*. 1998a; 79 (Pt 6): 1439-1443.

Oura CA, PP Powell and RM Parkhouse. African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J Gen Virol*. 1998b; 79 (Pt 6): 1427-1438.

Petrini S, F Feliziani, C Casciari, M Giammarioli, C Torresi and GM De Mia. Survival of African swine fever virus (ASFV) in various traditional Italian dry-cured meat products. *Prev Vet Med*. 2019; 162: 126-130.

Pini A and LR Hurter. African swine fever: an epizootiological review with special reference to the South African situation. *J S Afr Vet Assoc.* 1975; 46(3): 227-232.

Plowright WP, J. The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1967; 21(3): 383-402.

Ruenphet S, D Punyadarsaniya, T Jantafong and K Takehara. Stability and virucidal efficacies using powder and liquid forms of fresh charcoal ash and slaked lime against Newcastle disease virus and Avian influenza virus. *Vet World.* 2019; 12(1): 1-6.

Salguero FJ, PJ Sanchez-Cordon, A Nunez, M Fernandez de Marco and JC Gomez-Villamandos. Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol.* 2005; 132(4): 289-302.

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

Sanchez-Vizcaino JM, L Mur, JC Gomez-Villamandos and L Carrasco. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Pathol.* 2015; 152(1): 9-21.

Sanchez-Vizcaino JM, L Mur and B Martinez-Lopez. African swine fever: an epidemiological update. *Transbound Emerg Dis.* 2012; 59 Suppl 1: 27-35.

Šatrán P. African swine fever in wild boar in the Czech Republic. 2019. Retrieved on 25.02.2019.

Sauter-Louis C, JH Forth, C Probst, C Staubach, A Hlinak, A Rudovsky, D Holland, P Schlieben, M Goldner, J Schatz, S Bock, M Fischer, K Schulz, T Homeier-Bachmann, R Plogemann, U Klaass, R Marquart, TC Mettenleiter, M Beer, FJ Conraths and S Blome. Joining the club: First detection of African swine fever in wild boar in Germany. *Transbound Emerg Dis.* 2020; 68(4): 1744-1752.

Schachtschabel S. *Lehrbuch der Bodenkunde.* Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag; 2010

Schlafer DH and CA Mebus. Abortion in sows experimentally infected with African swine fever virus: pathogenesis studies. *Am J Vet Res.* 1987; 48(2): 246-254.

Schmitz AP, M.; Le Bouquin, S.; Rousset, N.; Ogor, K.; LeBras, M.O.; Martenot, C.; Daniel, P.; Belen Cepeda Hontecillas, A.; Scoizec, A.; et al. Natural and Experimental Persistence of Highly Pathogenic H5 Influenza Viruses in Slurry of Domestic Ducks, with or without Lime Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020; 86(24): e02288-20.

Schneider T, Bohm, R., Strauch, D. . Untersuchungen über den Einsatz von Branntkalk zur Desinfektion von Stallböden. *Tierarztl Umsch.* 1992; 47: 534-538.

Shirai J, T Kanno, Y Tsuchiya, S Mitsubayashi and R Seki. Effects of chlorine, iodine, and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses. *J Vet Med Sci.* 2000; 62(1): 85-92.

Sprössig M. Anwendungsmöglichkeiten der Peressigsäure für die Desinfektion und Sterilisation. *Hyg.und Med.* 1979; 4: 294-299.

Sprössig M. Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten der Peressigsäure - 25 Jahre Erfahrung und Entwicklung. *Hyg Med.* 1989; 14: 498-501.

Stiftung B. Bodenhorizonte. <https://www.baywastiftung.de/blog/beitrage-landwirtschaft/boden>. 2021.

Tack J. Wild boar (*Sus scrofa*) populations in Europe - A scientific review of population trends and implications for management. Brüssel, European Landowners' Organization. 2018; 56.

Ticháček B. Peressigsäure. Handbuch der Desinfektion und Sterilisation. PvM Horn H., Weuffen W. Berlin, VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin; 1978; 1: 162-177.

Turner C and SM Williams. Laboratory-scale inactivation of African swine fever virus and swine vesicular disease virus in pig slurry. *J Appl Microbiol.* 1999; 87(1): 148-157.

Von Rheinbaben F and S Werner. Peressigsäure und Desinfektionsmittel auf Peressigsäurebasis – Eigenschaften, Anwendungsgebiete und Wirksamkeit. *Dialyse aktuell.* 2014; 18(4): 216-223.

Wales AD and RH Davies. Disinfection to control African swine fever virus: a UK perspective. *J Med Microbiol.* 2021; 70(9): 001410.

Wallhäuser KH. Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung, Betriebshygiene. Stuttgart, Georg Thieme Verlag; 1988

Wang G, M Xie, W Wu and Z Chen. Structures and Functional Diversities of ASFV Proteins. *Viruses.* 2021; 13(11): 2124.

Wasiak K. Untersuchungen zur Inaktivierung von ausgewählten Krankheitserregern und Indikatororganismen im Boden bei der Anwendung von thermischen Verfahren und Kalk [Dissertation med. vet.] Justus-Liebig-Universität Gießen. 2009.

Wilkinson P. The persistence of African swine fever in Africa and the Mediterranean. *Prev Vet Med.* 1984; 2: 71–82.

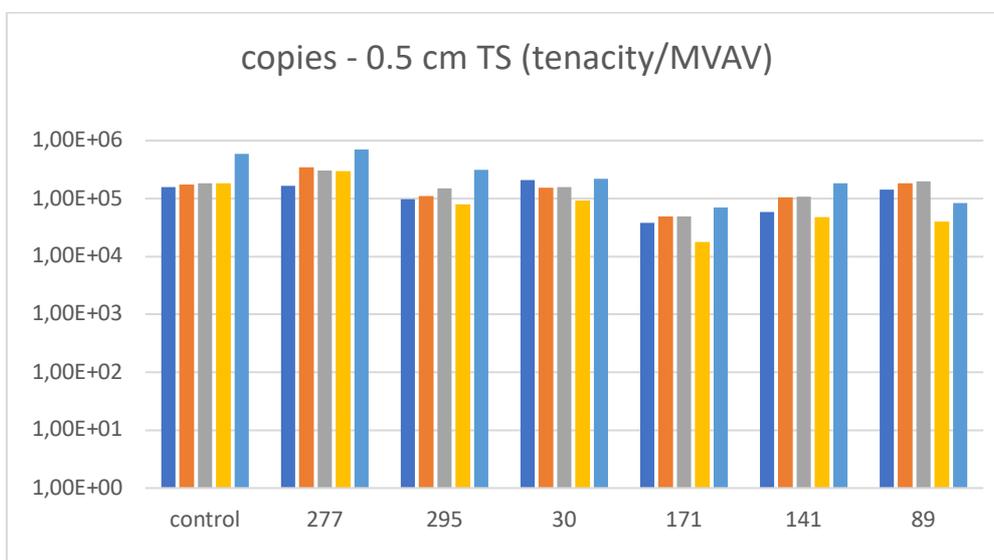
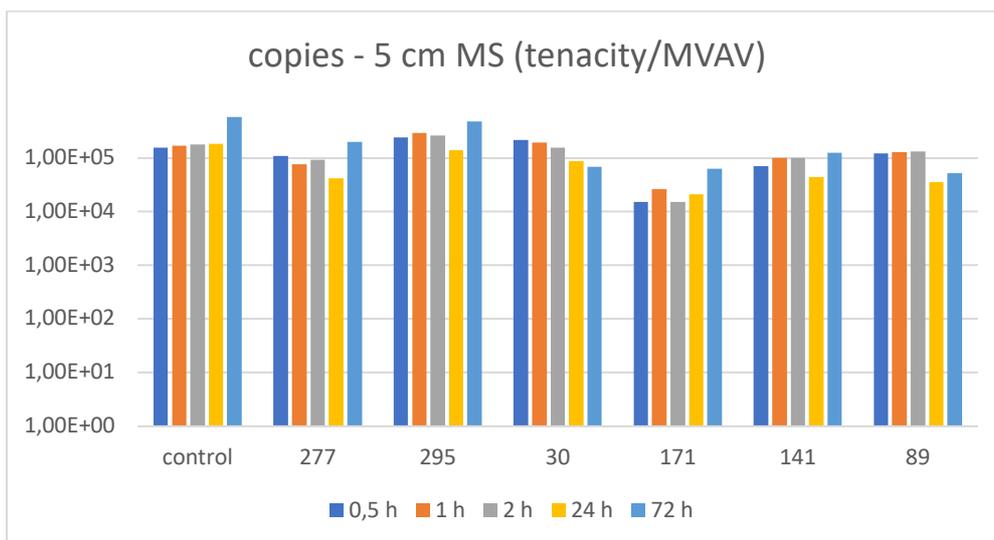
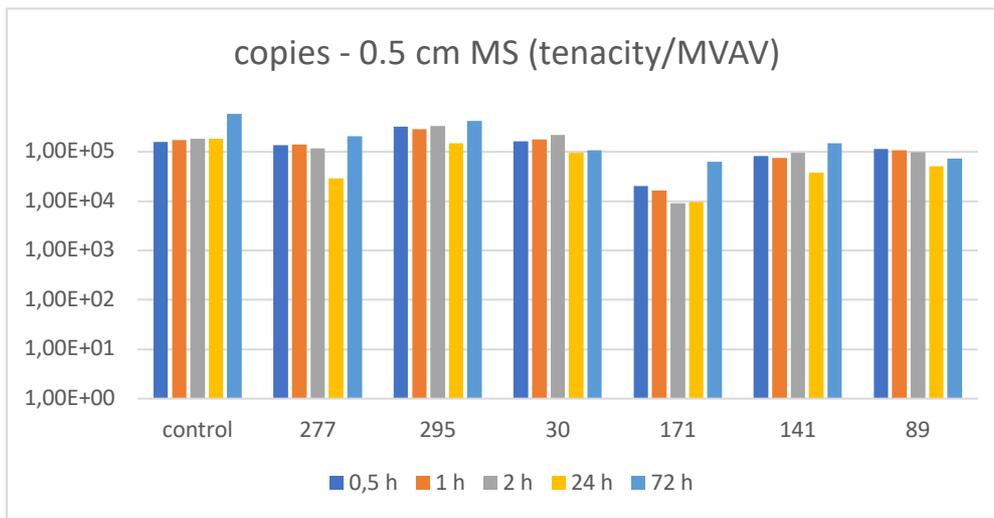
Wobus CE, LB Thackray and HWt Virgin. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol.* 2006; 80(11): 5104-5112.

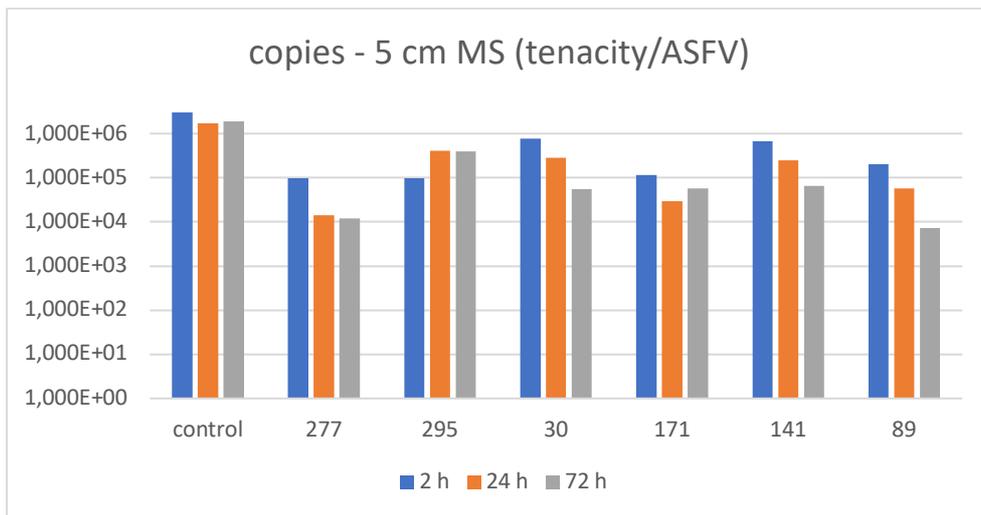
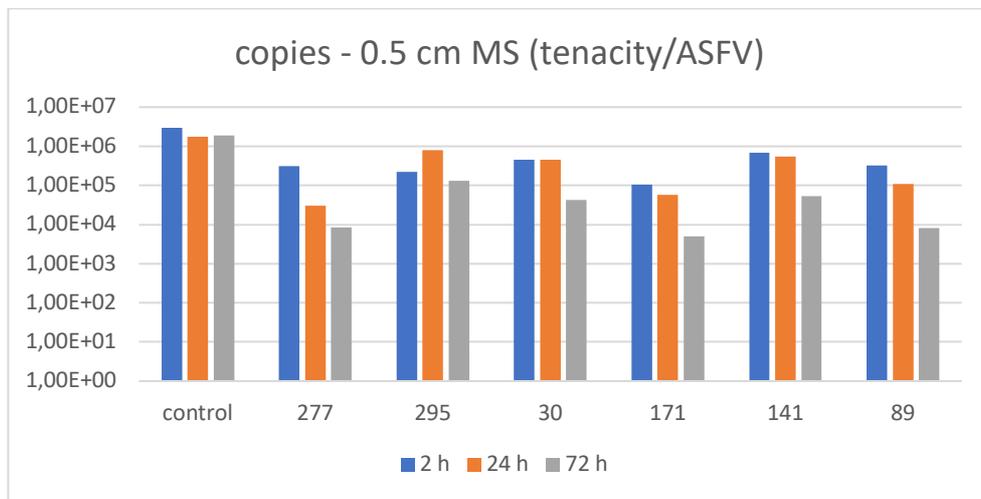
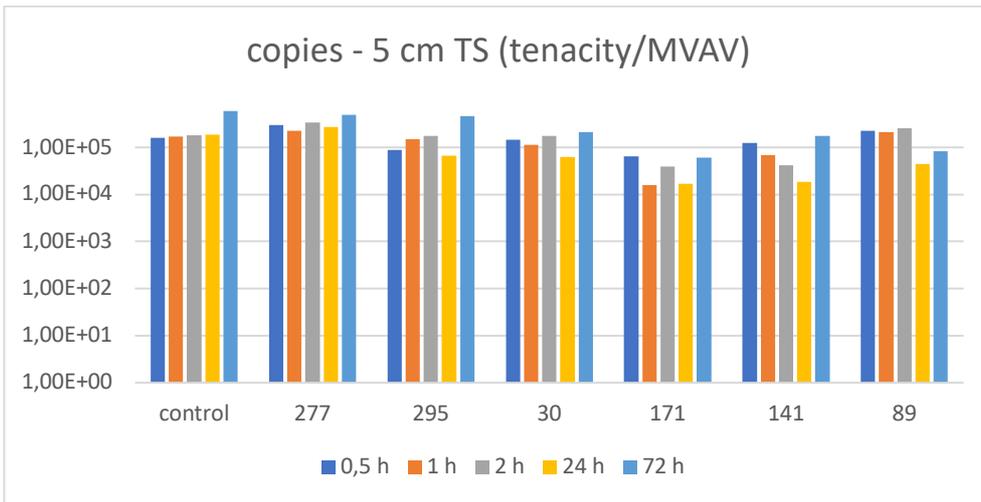
Yanez RJ, JM Rodriguez, ML Nogal, L Yuste, C Enriquez, JF Rodriguez and E Vinuela. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology.* 1995; 208(1): 249-278.

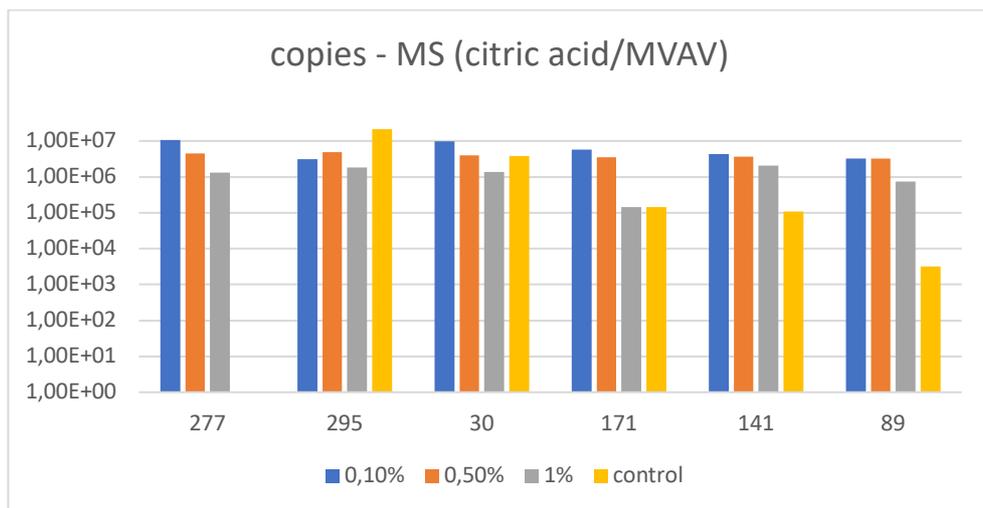
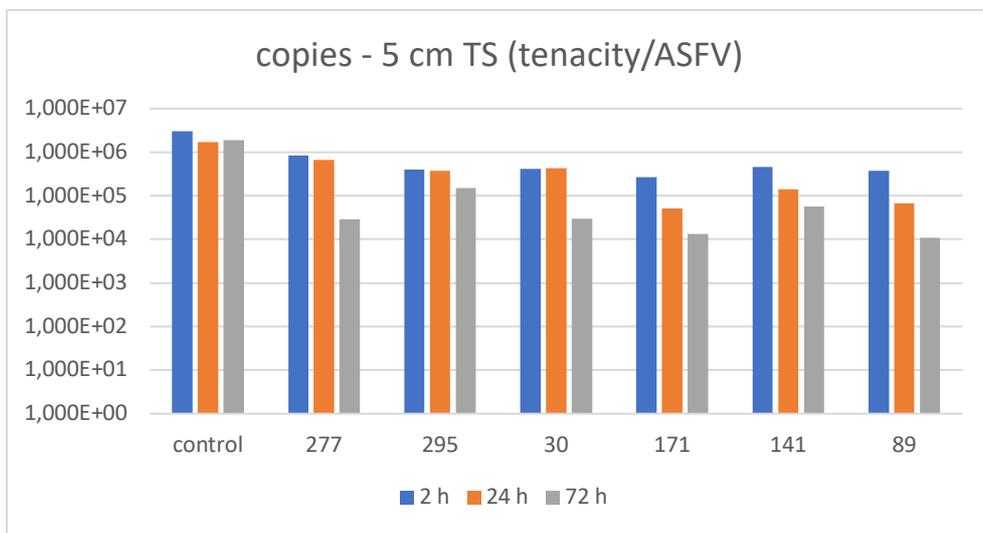
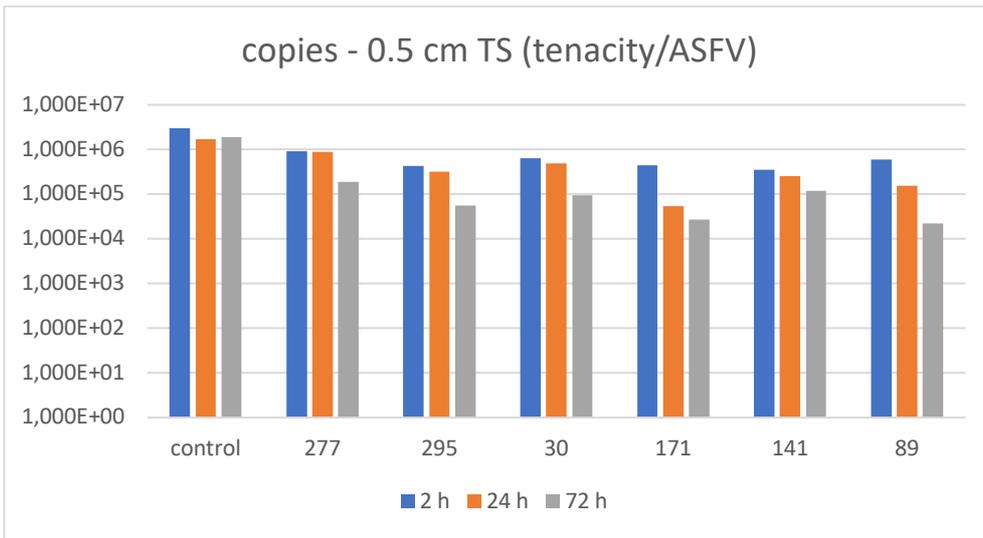
Zani L, M Masiulis, P Busauskas, K Dietze, G Pridotkas, A Globig, S Blome, T Mettenleiter, K Depner and B Karveliėne. African swine fever virus survival in buried wild boar carcasses. *Transbound Emerg Dis.* 2020; 67(5): 2086-92.

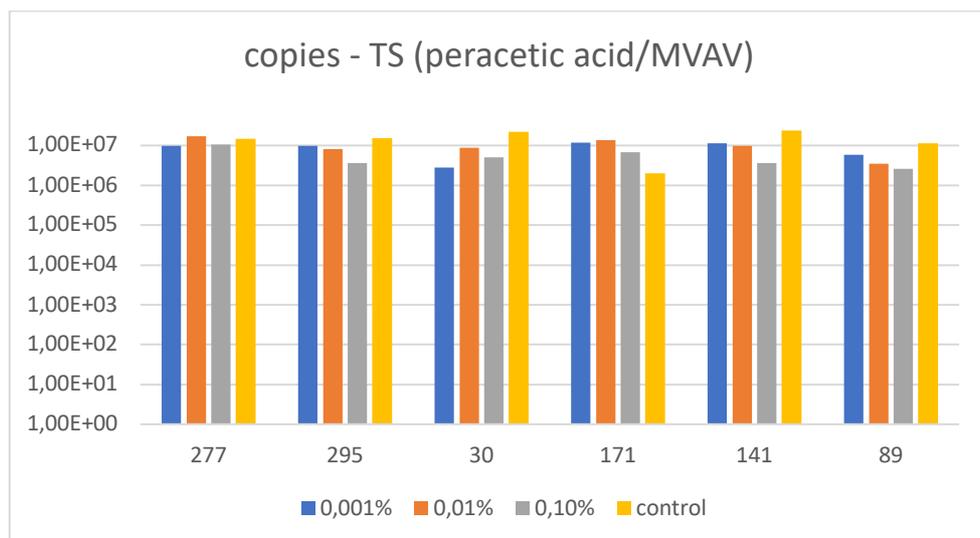
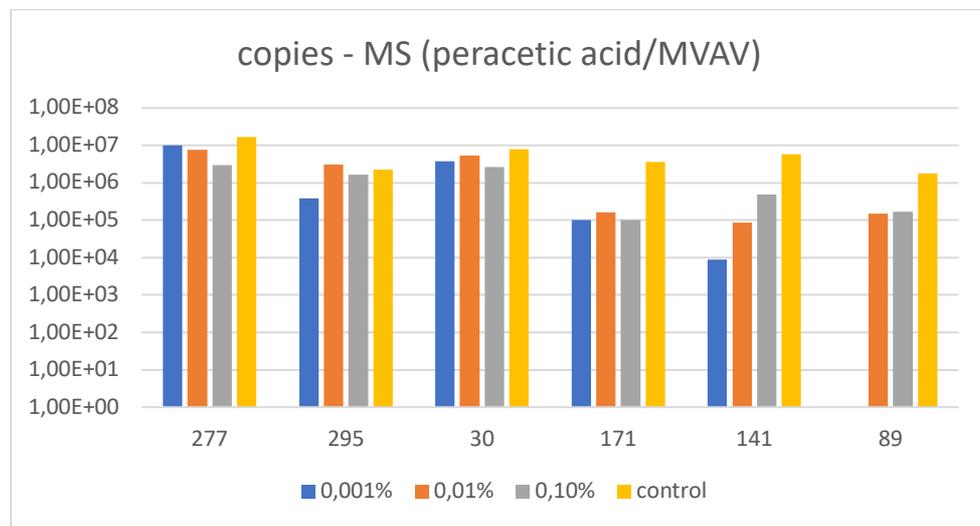
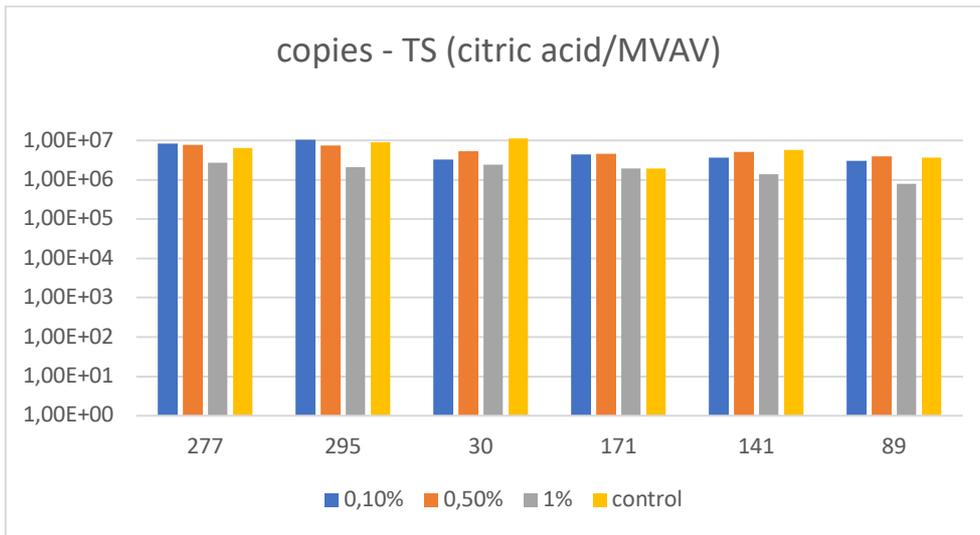
8 Anhang

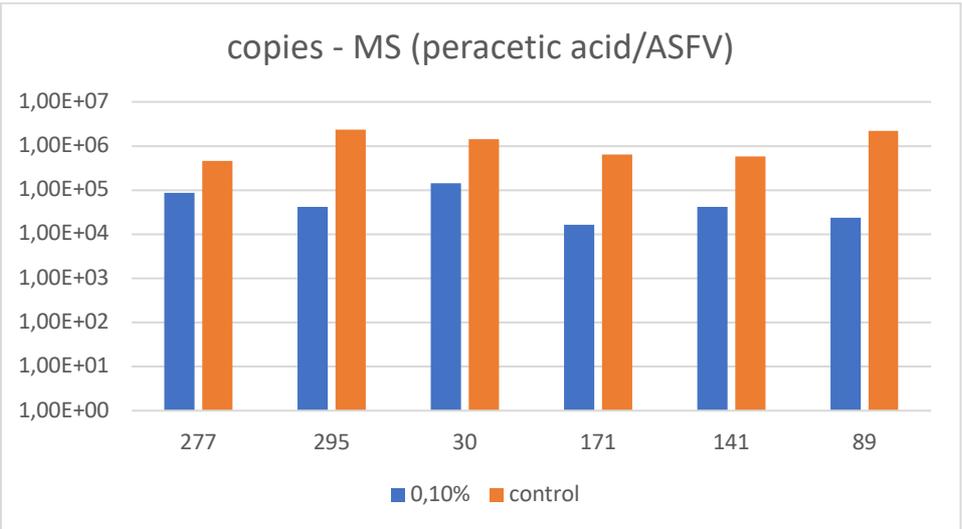
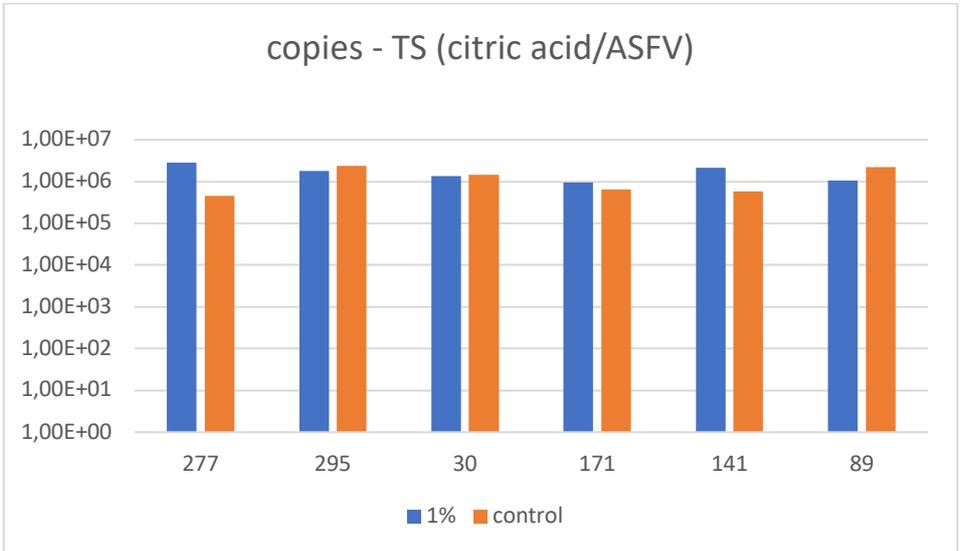
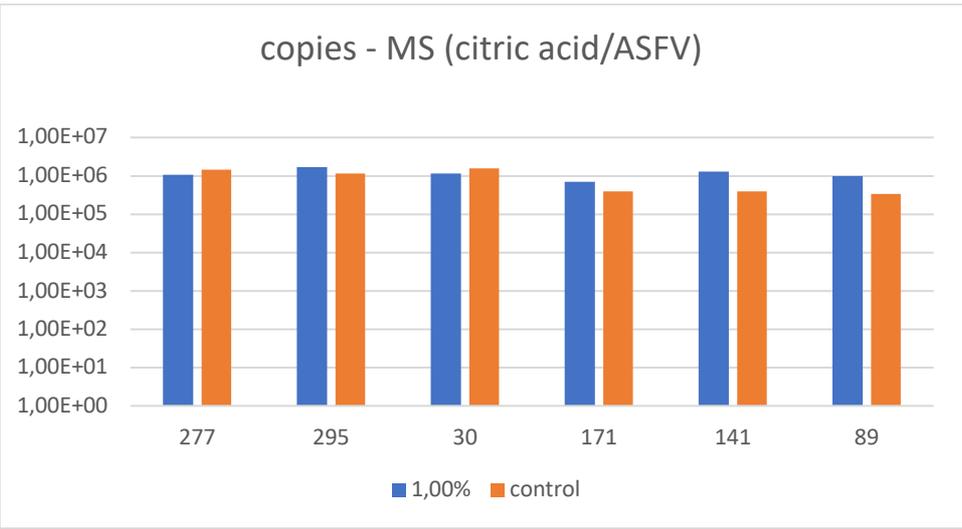
Anhang 1 – qPCR-Daten Publikation 1 (S. 20 - 30)

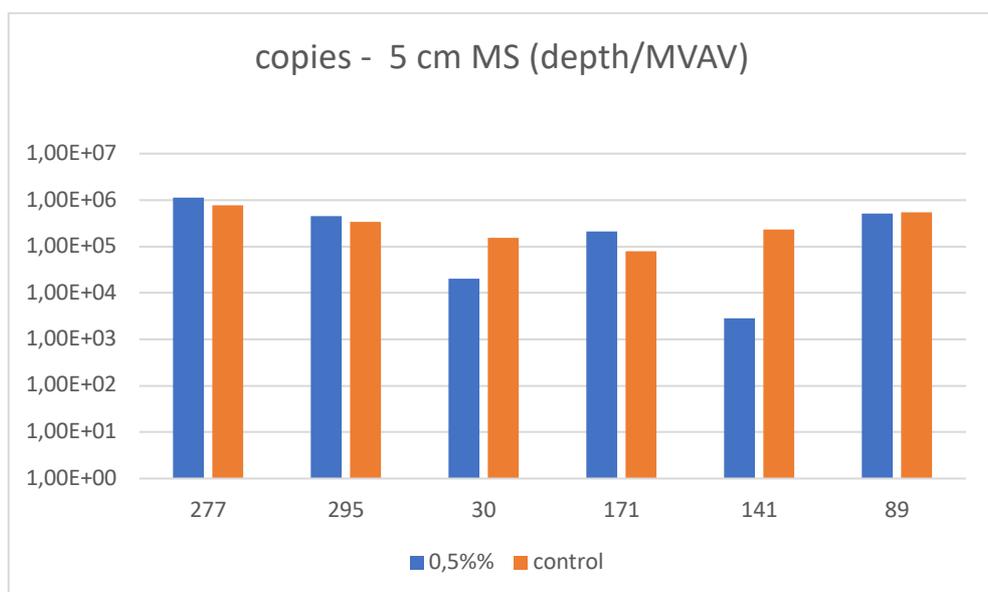
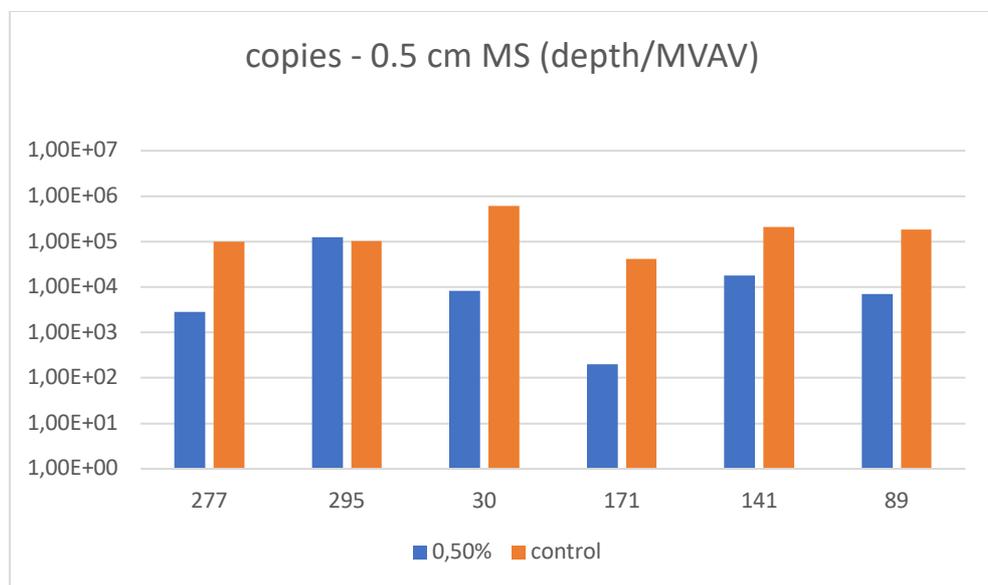
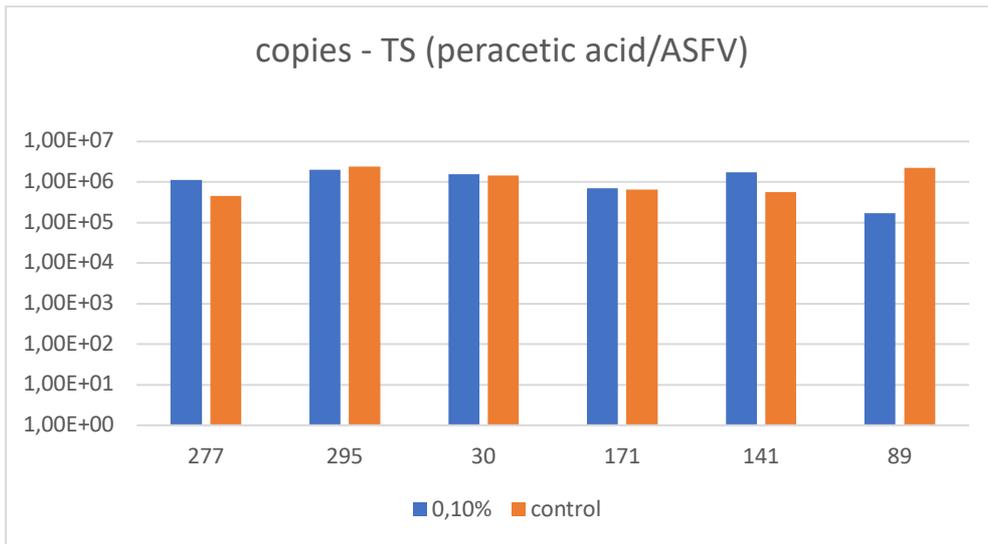


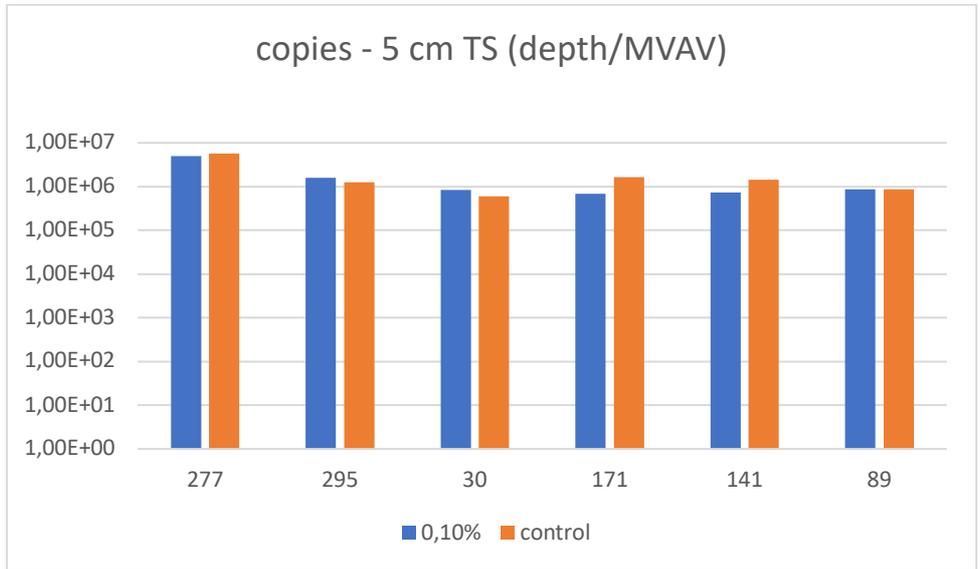
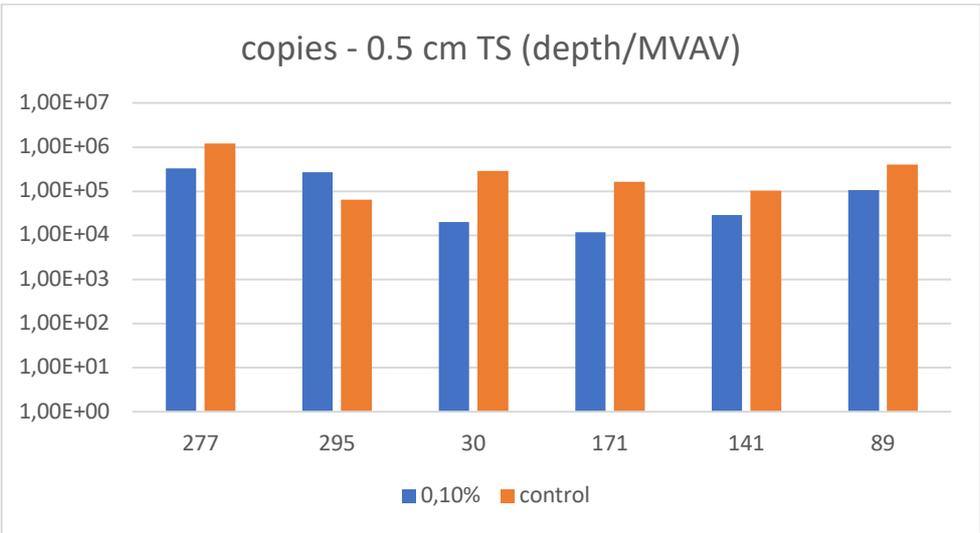












Anhang 2 – qPCR-Daten Publikation 2 (S. 32–43) – Kalk-Versuche - MVA – Of (Humus) der Bodenproben 277, 295, 30, 171, 141, 89

	277 - Of		295 - Of		30 - Of		171 - Of		141 - Of		89 - Of	
	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien
Löschkalk	28,475	4,01E+03	29,57	1,99E+03	31,265	1,12E+03	26,4	9,58E+03	29,005	6,60E+03	29,5	1,58E+03
Kalkmilch	30,835	1,34E+03	31,425	3,83E+03	31,25	1,72E+03	31,035	2,28E+03	31,625	1,09E+03	33,775	9,50E+02
Brantkalk	30,22	4,93E+02	29,46	1,01E+03	31,755	1,92E+02	29,705	1,34E+03	31,75	3,40E+02	31,585	2,37E+02

	277 - Of - Ko		295 - Of - Ko		30 - Of - Ko		171 - Of - Ko		141 - Of - Ko		89 - Of - Ko		MVA + PBS	
	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien	ct	Kopien
Löschkalk	23,9	3,54E+04	23,05	5,95E+04	23,4	5,17E+04	25,99	1,18E+04	24,44	2,55E+04	24,54	2,41E+04	23,275	5,78E+04
– Vers.														
Kalkmilch	28,58	5,01E+03	24,75	4,15E+04	26,07	2,59E+04	24,01	6,05E+04	27,83	9,00E+03	23,64	7,28E+04	21,7	2,42E+05
– Vers.														
Brantkalk	23,29	4,42E+04	22,79	6,12E+04	22,32	8,94E+04	24,3	2,53E+04	24,47	2,32E+04	24,46	2,23E+04	23,125	5,45E+04
– Vers.														

Anhang 3 – qPCR-Daten Publikation 2 (S. 32 – 43) – Kalk-Versuche - MVA – A (Mineralboden) der Bodenproben 277, 295, 30, 171, 141, 89

	277 - A		295 - A		30 - A		171 - A		141 - A		89 - A	
	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien
Löschkalk	31,585	3,31E+02	29,555	1,27E+03	29,515	1,17E+03	29,31	1,33E+03	29,01	1,70E+03	30,93	8,91E+02
Kalkmilch	31,755	1,16E+03	32,73	9,96E+02	32,095	1,79E+03	33,335	5,05E+02	33,205	5,26E+02	31,11	1,63E+03
Brantkalk	30,55	3,97E+02	30,62	5,60E+02	30,085	6,46E+02	31,865	2,60E+02	31,32	5,35E+02	30,48	4,27E+02

	277 - A - Ko		295 - A - Ko		30 - A - Ko		171 - A - Ko		141 - A - Ko		89 - A - Ko		MVA + PBS	
	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien
Löschkalk	24,095	4,65E+04	27,7	4,46E+03	28,47	9,33E+02	26,165	5,14E+03	34,38	3,42E+03	38,53	3,31E+04	22,86	3,78E+04
– Vers.														
Kalkmilch	26,22	2,34E+04	26,69	9,58E+03	27,62	1,35E+04	28,275	8,05E+03	28,25	1,02E+04	38,495	1,47E+03	22,55	1,67E+05
– Vers.														
Brantkalk	23,165	4,87E+04	38,9	1,60E+03	31,825	2,23E+02	26,535	6,02E+03	28,185	4,87E+03	29,655	2,55E+03	23,275	4,71E+04
– Vers.														

**Anhang 4 – qPCR-Daten Publikation 2 (S. 32 – 43) – Zusatz/Kalk-Wasser-Verhältnis – MVA - Of und A (Humus und Mineralboden)
von Bodenprobe 277**

	0		1:2		1:3		1:5		1:9		MVA + PBS	
	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien
Löschkalk	35,99	9,96E+00	34,79	3,14E+01	32,525	9,84E+01	30,495	4,09E+02	31,1	2,96E+02	25,855	8,58E+03
- Of												
Branntkalk	35,64	3,05E+01	33,575	4,57E+01	30,31	6,89E+02	29,015	1,35E+03	31,97	2,41E+02	24,14	5,01E+04
- A												

	0		1:2		1:3		1:5		1:9		MVA + PBS	
	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien
Löschkalk	32,825	1,76E+02	33,22	1,38E+02	35,215	2,89E+01	33,665	4,75E+01	32,39	1,90E+02	26,47	5,61E+03
- A												
Branntkalk	32,35	1,09E+02	33,3	1,68E+02	32,915	2,48E+02	30,62	4,65E+02	31,795	1,78E+02	25,935	1,46E+04
- A												

Anhang 5 – qPCR-Daten Publikation 2 (S. 32 – 43) – ASFV – Of und A (Humus und Mineralboden) der Bodenproben 277, 295, 30, 171, 141, 89

	277 - Of		295 - Of		30 - Of		171 - Of		141 - Of		89 - Of		ASFV + PBS	
	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien
Lösch- kalk	25,42	1,44E+02	23,675	4,62E+02	24,705	2,41E+02	24,355	2,93E+02	23,845	4,24E+02	25,745	1,26E+02	-	-
Kalk- milch	24,3	3,14E+02	23,29	6,05E+02	23,125	6,75E+02	23,27	6,18E+02	24,12	3,94E+02	24,61	2,75E+02	-	-
Brannt- kalk	25,865	1,05E+02	25,01	1,89E+02	25,91	1,04E+02	25,435	1,41E+02	24,665	1,66E+02	25,83	1,08E+02	-	-
Kontr.	24,12	3,42E+02	23,12	6,92E+02	22,82	8,27E+02	24,11	3,45E+02	23,72	4,53E+02	23,06	7,05E+02	22,9	7,88E+02

	277 - A		295 - A		30 - A		171 - A		141 - A		89 - A		ASFV + PBS	
	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien	cT	Kopien
Lösch- kalk	27,95	3,53E+01	27,74	3,42E+01	27,91	3,97E+01	30,19	6,50E+00	29,17	1,64E+01	29,60	1,13E+01	-	-
Kalk- milch	27,44	8,28E+01	26,6	9,50E+01	26,06	1,21E+02	30,06	9,30E+00	27,05	6,23E+01	27,61	4,67E+01	-	-
Brannt- kalk	28,71	2,99E+01	27,43	4,09E+01	27,23	5,85E+01	30,14	1,02E+01	29,00	2,21E+01	29,4	1,68E+01	-	-
Kontr.	23,62	5,18E+02	24,69	2,58E+02	24,01	4,02E+02	26,33	8,62E+01	25,16	1,88E+02	25,5	1,49E+02	23,08	8,32E+02

Anhang 6

Handlungsempfehlung bei Funden von Wildschweinkadavern in Zusammenhang mit ASP

Der Tierkörper sowie sämtliche Organe eines infizierten Wildschweins sind als infektiös zu betrachten. Insbesondere das Blut enthält hohe Viruskonzentrationen.

Maßnahmen:

1. Kennzeichnen der Fundstelle und Georeferenzierung
2. Sichern des Kadavers gegen Raubtiere und Beutegreifer
3. Fotodokumentation des Kadavers
4. Bergen des Kadavers beziehungsweise aller Teile des Kadavers unter Biosicherheitsbedingungen, die eine Verschleppung des Virus vermeiden:
Tragen Sie Handschuhe und desinfizierbare Schuhe. Die Kleidung sollte leicht zu reinigen und zu desinfizieren zu sein, beziehungsweise nutzen Sie vorzugsweise Einwegkleidung.
5. Sichere Lagerung des Kadavers bis zum Abtransport (Kadaversammelpunkte)
6. Sicherer Transport des Kadavers zur Tierkörperbeseitigungsanstalt
7. Desinfektion des Waldbodens unter dem Kadaver (direkte Ablage) und bei fortgeschrittener Verwesung ggf. 10 cm um den Kadaver herum
8. Desinfektion sichtbarer Schweißspuren und nachfolgendes Abdecken der Spur mit Waldboden
9. Desinfizieren Sie so weit möglich nach jeder Bergung vor Ort Ihre Schuhe, Kleidung und Handschuhe mit der Desinfektionsmittelgebrauchslösung.

Desinfektionsmittel:

Desinfektionsmittel: 0,5% Peressigsäure* (z.B. Wofasteril, Lerasept oder andere)

Peressigsäuregebrauchslösung ist in einer Konzentration von 0,5%* arbeitstäglich neu anzusetzen.

Die Desinfektionslösung soll mit einem geeigneten Dispenser (Gießkannenbrause, Gartenspritze, Drucksprüher, o.ä.) gleichmäßig auf den zu desinfizierenden Boden ausgebracht werden.

Wichtig ist die **Ausbringungsmenge der Gebrauchslösung von mindestens 5 Litern pro Quadratmeter.**

Desinfektionsmittel: Löschkalk, Branntkalk, Kalkmilch

Für die zuverlässige Desinfektion eines **Bodenvolumens von 1 m x 1 m x 0,5 cm** sind entweder **mindestens 735 g Branntkalk oder Löschkalk** auszubringen. Der Kalk ist mit einer Harke in den Boden einzuarbeiten.

Grundsätzlich ist eine zusätzliche **Wasserzugabe nicht unbedingt notwendig**; lediglich bei ausgesprochen trockenem Waldboden empfiehlt sich eine anschließende Befeuchtung der Bodenfläche mit **maximal 5 l Wasser pro Quadratmeter**. Eine nachfolgende wiederholte Einarbeitung in den Boden ist sinnvoll.

Aufgrund der vergleichbaren Wirksamkeit sollte wegen der potentiellen Waldbrand- und Gesundheitsgefahr beim Desinfektionsvorgang Löschkalk dem Branntkalk vorgezogen werden.

Alternativ kann die Ausbringung von Kalkmilch in einer Konzentration von **10%*¹** und einer Menge von **mindestens 5 l pro Quadratmeter** erfolgen. Auch hier sollte eine Einarbeitung in den Boden mit einer Harke erfolgen. Die Gebrauchslösung der Kalkmilch ist in der Konzentration von 10% arbeitstäglich frisch herzustellen*¹.

Bei der Anwendung der 10%igen Kalkmilch ist der Kalkeinsatz pro Quadratmeter geringer als bei der Ausbringung von pulvrigem Kalk.

*Beispiele zur Herstellung von 10 Litern einer Gebrauchslösung von 0,5%:

- a) Peressigsäure-Konzentrat 40%, davon 125 ml zu 9,875 l Wasser geben
- b) Peressigsäure-Konzentrat 15%, davon 333 ml zu 9,666 l Wasser geben

Beim Umgang mit dem Peressigsäure-Konzentrat ist eine persönliche Schutzausrüstung in Form von Schutzhandschuhen (Nitopren) sowie Schutzbrille bzw. Gesichtsschutz vorgeschrieben.

Beim Umgang mit der Gebrauchslösung sind nur die allgemeinen Arbeitsschutzregeln einzuhalten: Schutzbrille bei Spritzgefahr und flüssigkeitsdichte Einmalhandschuhe, ein Atemschutz ist nicht erforderlich.

*¹ Beispiele zur Herstellung von 10 Litern einer Gebrauchslösung von 10% Kalkmilch:

Zu 1 kg Löschkalk sind 9 l Wasser vorsichtig hinzuzugeben und bis zur vollständigen Lösung des Kalks zu verrühren.

Kalk ist in all seinen Formen (Lösch-, Branntkalk, Kalkmilch) stark ätzend. Entsprechende persönliche Schutzvorkehrungen (Staubschutzmaske, Schutzbrille, Handschuhe, lange Arbeitskleidung, geschlossenes Schuhwerk) sind beim Umgang zu treffen.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich besonders herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Truyen für die Ermöglichung dieses Projektes sowie für die umfassende Betreuung bedanken. Durch seine immer neuen Denkanstöße bekam meine Arbeit stets neuen Antrieb sowie den richtigen Tiefgang.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Ahmed Abd El Wahed für sein stets offenes Ohr sowie seinen unerschütterlichen Optimismus in jeder noch so schwierigen Lage. Dank seines Knowhows und seiner Kreativität hat er erheblich zum Gelingen dieses Projektes beigetragen und mich auf dem Weg zur Fertigstellung meiner Dissertation begleitet.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Dr. Sandra Blome und ihrem Labor-Team sowie Dr. Melina Fischer aus dem Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Instituts auf der Insel Riems für die großartige Beratung sowie Betreuung während meines Forschungsaufenthalts im November 2020. Ebenso gilt mein Dank Dr. Melina Fischer, Paul Deutschmann, Hanna Roszyk und Tessa Carrau für die Durchführung unserer Versuchsreihen im August 2021. Ohne sie wäre die Durchführung dieser Versuche aufgrund der Einschränkungen durch die Pandemielage nicht möglich gewesen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig für die wunderbare Zeit und Hilfe in jeglicher Lebenslage. Namentlich hervorheben möchte ich hierbei Nadja Leinecker, Mario Reinhardt, Dana Rüster sowie Robert Küchler. Sie haben mich auf meinem ganzen Weg mit aller Kraft bei der Versuchsdurchführung und Datenerhebung unterstützt und mich an ihrem Wissen teilhaben lassen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frank Jacob vom Staatsbetrieb Sachsenforst für seine unermüdliche Unterstützung bei der Bodenprobenentnahme, sowie -analyse bedanken.

Für die finanzielle Projektunterstützung bedanke ich mich beim Sächsischen Staatsministerium für Soziales und Gesellschaftlichen Zusammenhalt.

Nicht vergessen möchte ich meine Eltern, meine Schwester, meine beste Freundin sowie all die anderen lieben Menschen um mich herum, die mich unentwegt seelisch und moralisch unterstützt haben, egal wie mies meine Laune auch zwischenzeitlich war. Beständige Motivations- und Stimmungsschübe lieferten mir weiterhin Frank Petersen, Freddie Mercury, Peter Fox, Heinz Rudolf Kunze und der Dönermann meines Vertrauens.

Ihr seid die Besten!