

Amtliche Methodensammlung

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Mycoplasma mycoides subspecies *mycoides* (*Mmm*). Es handelt sich dabei um die kleinsten auf zellfreiem Medium wachsenden Bakterien (0,3 bis 0,8 µm), die zur Klasse *Mollicutes* gehören. Sie besitzen keine Zellwand und bilden auf festem Nährmedium typische spiegeleiförmige Kolonien.

1.2 Klinische Symptomatik

Die Lungenseuche ist eine hochkontagiöse bakterielle Erkrankung der Rindergattung, bei der erwachsene Tiere in erster Linie am Atmungsapparat und Kälber vor allem an den Gelenken erkranken. Außer beim Hausrind kommt die Lungenseuche auch beim Büffel, Yak und Bison vor. Die Lungenseuche ist weit verbreitet in Afrika und einigen Ländern Asiens (aktuelles Vorkommen der Krankheit siehe unter <http://www.oie.int/hs2/report.asp>). In Europa traten die letzten Fälle 1999 in Portugal auf. Weitere Ausbrüche gab es bis in den 90er Jahren in Spanien und Italien. Deutschland ist seit vielen Jahren frei von Lungenseuche. Der letzte Fall in Deutschland stammt aus dem Jahre 1926. Aufgrund des verbreiteten Tierhandels besteht allerdings jederzeit Einschleppungsgefahr für Deutschland.

Der Erreger der Lungenseuche wird primär über ausgehustetes Sekret (aerogene Infektion) übertragen. Während der Inkubationszeit von 2 bis 6 Wochen (teilweise bis zu 6 Monate) wird der Erreger von den gesund erscheinenden Tieren bereits ausgeschieden. Die Krankheit beginnt mit trockenem, kurzem Husten und Fieber. Nach weiteren Wochen zeigen sich deutliche Atembeschwerden gekennzeichnet durch schmerzhaften Husten, Auswurf, schleimig-serumhaltigen Nasenausfluss, hohe Pulsfrequenz, Verstopfung und Durchfall im Wechsel, Abmagerung, geringe Harnausscheidung (dunkelgelb bis braun). Die Futteraufnahme, das Wiederkauen sowie die Milchleistung gehen zurück. Bei jungen Tieren verläuft die Krankheit oft schnell, bei älteren Tieren häufig langsamer. 50 bis 80 % der Fälle enden tödlich, wobei die Mortalitätsrate in neu infizierten Beständen höher ist als in Herden, in denen die Lungenseuche bereits vorher auftrat. Die Seuche breitet sich innerhalb eines Bestandes relativ langsam aus. Genesene chronisch infizierte Tiere bleiben jahrelang Ausscheider und sind eine ständige Ansteckungsquelle.

Bei Kälbern bis zu einem Alter von ca. 6 Monaten stehen meistens Polyarthritiden im Vordergrund. Bei ihnen führt die Krankheit schnell zu schmerzhaften und heißen Umfangsvermehrungen der Gelenke an den Gliedmaßen verbunden mit Lahmheiten (besonders Karpal- und Tarsalgelenke).

Gleichzeitiges Auftreten von Pneumonie-Symptomen bei erwachsenen Rindern und Arthritiden bei Kälbern geben einen wichtigen Hinweis auf das Vorliegen von Lungenseuche bei der klinischen Verdachtsdiagnose.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Grundsätzlich kann zwischen akuten und chronischen Verläufen unterschieden werden, wobei die klinische Diagnose bei chronischem Verlauf ungleich schwieriger ist als bei akuter Lungenseuche. Allerdings gibt es hier viele Übergangsformen.

1.3 Differentialdiagnose

Für die Differentialdiagnostik relevant sind unspezifische katarrhalische und fibrinöse Pneumonien, Wurmbefall, Rinderpest, Tuberkulose und die pectorale Form der Pasteurellose.

1.4 Diagnostische Indikation

Die Einleitung diagnostischer Untersuchungen wird auf der Grundlage folgender Feststellungen getroffen:

- klinische Symptome
- pathologische Veränderungen
- serologische Befunde
- epidemiologische Befunde

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

benannte Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsämter der Länder (siehe Anhang 1)

FLI, NRL für die Lungenseuche der Rinder, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena

Telefon: 03641/802100

Telefax: 03641/804228

1.6 Rechtsgrundlagen

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung

2. Untersuchungsmaterial

Von lebenden Tieren

ca. 10 ml Nativblut zur Serumgewinnung oder 5 ml Serum

5 ml Pleuralexsudat (Entnahme zwischen 7. und 8. Rippe im unteren Brustbereich)

Nasenabstriche (mit sterilen Nasentupfern)

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Von getöteten oder verendeten Tieren

verändertes Lungengewebe am Übergang zum gesunden Gewebe (ca. 4x 4x 4 cm)

Lnn. mediastinalis in toto, tributäre Lymphknoten

5 bis 10 ml Brusthöhlenexsudat

10 ml Blut (Herzblut)

von Kälbern auch Gelenkflüssigkeit

Transport

Die Proben sind schnellstmöglich in gekühltem, nicht gefrorenem Zustand an die untersuchende Stelle zu senden.

Das Untersuchungsmaterial muss vorschriftsmäßig in dicht schließenden Behältnissen verpackt und zusammen mit dem Vorbericht und dem Untersuchungsantrag an die zuständige Untersuchungseinrichtung geschickt werden. Versandbehältnis und Probengefäße müssen eindeutig beschriftet sein. Dabei sind folgende Vorschriften einzuhalten:

Gefahrgutverordnung für den Transport auf der Straße bzw. mit der Eisenbahn

Infektionsschutzgesetz

IATA-DGR in der jeweils gültigen Fassung für den Transport auf dem Luftweg

DIN EN 829

Der Einsender sollte zum frühestmöglichen Zeitpunkt das Untersuchungslaboratorium von der bevorstehenden Sendung in Kenntnis setzen.

Im Anschreiben ist anzugeben:

- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. dienstlicher und eventuell privater Telefon- und Fax-Nummer)
- Was wird eingesandt? (Art des Materials, von welchen Tieren, Anzahl etc.)
- Aus welchem Bestand stammen die Proben?
- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)

Zusätzliche Angaben, soweit möglich:

- Wie groß ist der Bestand?
- Art des Bestandes (Zucht-, Mast-, Händlerbestand etc.)?
- Bestehen Kontakte zu Lungenseuche-verseuchten Gebieten?
- Bemerkungen und weitere Hinweise auf eine mögliche Erregereinschleppung.

3. Untersuchungsgang

Die Lungenseuche gilt als **nachgewiesen**, wenn der Erreger in der zuständigen Untersuchungseinrichtung zweifelfrei **identifiziert** wurde. Die zuständige Untersuchungseinrichtung ist das nationale Referenzlabor für die Lungenseuche der Rinder in Jena.

Serologische Reaktionen in Verbindung mit einem epidemiologischen Kontakt zu einem Lungenseuche-Ausbruch oder mehrere serologisch positive Befunde in einer Rinderherde führen, unabhängig vom Vorliegen klinischer bzw. pathologisch-anatomischer Befunde, zu einem **Lungenseuche-Verdacht**. Der Verdacht kann nur durch den Amtstierarzt ausgesprochen werden. Dies gilt ebenfalls für die amtliche Feststellung eines Lungenseuche-Ausbruchs. Die KBR ist laut OIE das vorgeschriebene serologische Testverfahren. Alternativ kann ein kommerziell verfügbarer kompetitiver ELISA nach den Vorgaben der OIE angewendet werden. Dieser ist allerdings für Deutschland nicht zugelassen und somit nur im nationalen Referenzlabor Jena bzw. nur nach Ausnahmegenehmigung in den entsprechenden Landesbehörden anwendbar.

Erregernachweis bei Verdacht auf Lungenseuche

Die Anzucht von Mykoplasmen ist in den meisten Untersuchungsämtern möglich und dauert im Durchschnitt 5 bis 7 Tage, die darauf folgende Erregerdifferenzierung noch weitere 10 bis 12 Tage. Ein negatives Ergebnis wird innerhalb von 10 Tagen ausgewiesen. Der positive Nachweis kann bis zu 20 Tagen in Anspruch nehmen.

Wichtiger Hinweis: Bei Verdacht eines Erstausbruchs ist Organmaterial einschließlich evtl. vorhandener oder verdächtiger bereits isolierter Kulturen, verdächtige Seren bzw. Blutproben parallel direkt an das Referenzlabor für die Lungenseuche der Rinder zu senden (FLI, Standort Jena, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Tel. 03641-802100). Die Proben sind vorher telefonisch anzumelden (siehe auch unter Untersuchungsmaterial).

Im positiven Fall ist mittels PCR ein sicherer Nachweis innerhalb von 48 Stunden möglich. Die PCR wird im nationalen Referenzlabor für Lungenseuche durchgeführt.

Werden in den Untersuchungsämtern bei der serologischen Untersuchung auf Lungenseuche mittels KBR positive Proben festgestellt, so sind diese Tiere bis zur Abklärung im nationalen Referenzlabor als Verdachtsfälle einzustufen und der entsprechende Bestand ebenfalls als verdächtig für die Lungenseuche zu behandeln, auch wenn keine weiteren Hinweise für das Vorliegen eines Lungenseucheausbruchs sprechen. Dem Referenzlabor sind in diesem Fall neue Blutproben (ohne Gerinnungshemmer) sowie Nasentupfer der entsprechenden Tiere zuzuleiten.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

3.1 Erregernachweis

Anzüchtung

Als Mykoplasmen-Nährmedien werden Medium B-Bouillon (Anhang 2) und -Agar (Anhang 3) verwendet. Zur Unterdrückung der bakteriellen Begleitflora muss bei der Primärisolierung dem flüssigen Nährmedium unmittelbar vor der Beimpfung Penicillin (1000 IE/ml) zugesetzt werden.

Zur Beimpfung sind möglichst kleine Stücke des Untersuchungsmaterials in das flüssige Nährmedium einzubringen, d. h. je ein stecknadelkopfgroßes Organstückchen (Die Ausgangsproben sollten vor dem Zerkleinern zwecks Beseitigung von Begleitflora kurz abgeflammt werden.)

Das beimpfte flüssige Nährmedium wird 4 bis 5 Tage bei 37 °C bebrütet. Danach wird die Kultur auf Medium B-Agar übertragen und anschließend 2 bis 4 Tage bei 37 °C in feuchter Umgebung und bei 3 bis 5 % CO₂ inkubiert.

Das Mykoplasmenwachstum kann auf der Agarplatte mikroskopisch mit einer Lupenvergrößerung bei leicht dezentriertem grünem Licht beurteilt werden. *Mmm* entwickelt auf festen Nährmedien durchscheinende Kolonien von 0,1 bis 1 mm Durchmesser, welche meist als raue, vakuolisierende granuläre Formen erscheinen.

Immunfluoreszenztechnik (IFT):

Der gesamte Abschnitt ist gestrichen.

3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis wird nur im nationalen Referenzlabor durchgeführt.

3.2.1 DNA-Isolierung

Geräte, Materialien und Reagenzien

- Manual des High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Eppendorf-Zentrifuge (wenn möglich mit Kühlung)
- Vortex-Schüttler
- Eppendorf BioPhotometer oder Nanodrop1000 (Peglab, Wilmington, USA)
- FastPrep 24 Homogenisator (MP Biomedicals, Santa Ana, USA)
- AJ Lysis Tubes, Analytik Jena
- Präzisionspipetten, verschiedene Größen
- Filter-Tips, steril und DNase-frei (PCR-clean),
- Handschuhe
- Eppendorf-Tubes, 1,5 ml, 2 ml, steril und DNase-frei (PCR-clean)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

- Zellpuffer, steril (pH 7,4):
 - 1000 ml 0,1M Na₂HPO₄-Lösung
 - + 222 ml 0,1M KH₂PO₄-Lösung
- Entionisiertes Wasser

Durchführung

Alle Arbeitsschritte bis zur Zugabe des Lysepuffers werden unter der Sicherheitswerkbank im Geb.023/R. 218 oder Geb.023/R.220 durchgeführt und DNA-Extrakte bei -20 °C im Geb.023/R. 218 oder Geb.023/R.222 aufbewahrt.

Vorbereitungsschritte für alle Isolierungen:

- mit Einmalhandschuhen arbeiten
- Proteinase K (Gefäß 3 aus Roche-Kit) in 4,5 ml bidest. H₂O aufnehmen, aliquotieren und bei -20 °C lagern
- vor Erstgebrauch 80 ml Ethanol p.A. zu dem Waschpuffer (Gefäß 4, blauer Deckel) geben
- bei Beginn der DNA-Isolierung den Elutionspuffer (Gefäß 5) auf 70 °C vorwärmen

DNA-Isolierung aus Gewebe

- 25-50 mg Gewebe im 1,5 ml-Tube einwiegen und mit der Schere soweit wie möglich zerkleinern bzw. mit AJ-Lysis Tubes im FastPrep-24 2 x 30 s homogenisieren,
- 200 µl Gewebe-Lysepuffer (Gefäß 1, weißer Deckel) und 40 µl Proteinase K-Lösung zugeben
- mindestens 1 h bei 55 °C inkubieren (eventuell auch 2-3 h oder bei 37 °C über Nacht)
- 200 µl Bindungspuffer (Gefäß 2, grüner Deckel) zugeben, mischen und 10 min bei 70 °C inkubieren (Elutionspuffer 5 kann dabei mit vorgewärmt werden)
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- nicht lösliche Gewebestücke mittels einer Pipettenspitze entfernen, restliche Flüssigkeit mittels einer 1 ml-Pipette in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren (eventuell auch länger und bei etwas höherer Drehzahl, falls der Filter vom Gewebe verstopft wird)
- Durchlauf verwerfen, Sammelbehälter wiederverwenden
- 500 µl Inhibitorpuffer in das Filter-Tube pipettieren
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- 500 µl Waschpuffer in das Filter-Tube pipettieren (Gefäß 4, blauer Deckel)
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- Waschschrift wiederholen
- anschließend 10 s bei max. Geschwindigkeit (13.000 rpm) zentrifugieren
- Filter-Tube in ein sauberes 1,5 ml-Tube einsetzen

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

- zur Elution der Nukleinsäuren 200 µl des auf 70 °C vorgewärmten Elutionspuffers in das Filter-Tube pipettieren
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- die Nukleinsäuren sind stabil und können direkt in der PCR analysiert oder kurzzeitig bei 4 °C bzw. langfristig bei -20 °C gelagert werden

DNA-Isolierung aus Kulturflüssigkeit

- aus 6 ml 2-5 Tage alter Bouillon-Kultur 2 x 2 ml in Eppendorf-Tubes überführen und bei 13200 rpm 20 min zentrifugieren
- Sterilkontrolle auf Platte anlegen und restliche Kultur als Rückstellprobe bei -20 °C einfrieren
- Zellpellet nach Zentrifugation zweimal mit PBS waschen
- Pellet in 200 µl Lysepuffer lösen und 40 µl Proteinase K-Lösung zugeben
- mindestens 1 h bei 55 °C inkubieren
- 200 µl Bindungspuffer hinzufügen und mischen
- 10 min bei 70 °C inkubieren
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- weiter wie bei DNA-Isolierung aus Gewebe (3.2.1)

DNA-Isolierung aus Milch

- 300 µl Milch mit 200 µl Lysepuffer und 40 µl Proteinase K mischen
- 200 µl Bindungspuffer hinzufügen, mischen
- 10 min bei 70 °C inkubieren
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- weiter wie bei DNA-Isolierung aus Gewebe

DNA-Isolierung aus anderer Körperflüssigkeit

- 200 µl Körperflüssigkeit (bei weniger Volumen mit Zellpuffer auffüllen) in ein 1,5 ml-Tube pipettieren
- 200 µl Bindungspuffer (Gefäß 2, grüner Deckel) und 40 µl Proteinase K-Lösung zugeben
- nach Proteinase K-Zugabe sofort gut mischen und 10 min bei 70 °C inkubieren (Elutionspuffer 5 kann dabei mit vorgewärmt werden)
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- weiter wie bei DNA-Isolierung aus Gewebe

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

DNA-Isolierung aus Nasentupfern

- Nasentupfer mit oder ohne Transportmedium
- 1 ml-Pipettenspitze zur Hälfte abschneiden, in dieser halben Spitze im Tube Tupfer 2 min bei 1200 rpm zentrifugieren, um die gesamte Flüssigkeit aus dem Tupfer zu gewinnen
- Probenflüssigkeit vereinigen und 15-20 min bei 13200 rpm (höchste Drehzahl) zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 200 µl Lysepuffer (Roche-Kit) aufnehmen, 40 µl Proteinase K-Lösung und 200 µl Bindungspuffer (Roche-Kit) zugeben
- gut mischen und 10 min bei 70 °C inkubieren (Elutionspuffer 5 kann dabei mit vorgewärmt werden)
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- weiter wie bei DNA-Isolierung aus Gewebe

Ergebnis

Photometrische Messung:

- erfolgt zur Überprüfung der Reinheit und zur Einstellung eines definierten DNA- Gehaltes bei 260 nm gegen Leerwert Aqu.dest am Nanodrop1000 (direkte Messung in 2 µl DNA-Extrakt)
- alternativ kann auch das BioPhotometer von Eppendorf zur Messung verwendet werden
- der Absorption von 1 OD entsprechen ca. 50 µg/ml DNA
- mit dem Verhältnis A260/A280 kann die Reinheit der DNA abgeschätzt werden, dieser Wert sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen
- die Nukleinsäuren sind stabil und können direkt in der PCR analysiert oder bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert werden

3.2.2 Konventionelle PCR

Geräte, Materialien und Reagenzien

- Thermocycler (z.B. Biometra Uno, T3)
- Eppendorf-Zentrifuge (wenn möglich mit Kühlung)
- Vortexer
- Präzisionspipetten, verschiedene Größen
- passende Tips, steril und DNase-frei (PCR-clean), z.B. Eppendorf
- Handschuhe
- Eppendorf-Tubes, 0,2 ml, steril
- *Mollicutes*-spezifische PCR: Promokine Kit II
- *Mycoides*-Cluster-PCR und *Mmm*-PCR:
- dNTP-Mix, Taq-Polymerase, 10 x Taq-Polymerase-Puffer (z.B. 5 Prime, VWR)

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Primer:

für *Mycoides*-Cluster-PCR

F-REAP: 5´ GAAACGAAAGATAATACCGCATGTAG 3´

R-REAP: 5´ CCACTTGTGCGGGTCCCCGTC 3´

für *Mmm*-spezifische PCR

SC3NEST1-L: 5´ ACA AAA AGA AGA TAT GGT GTT GG 3´

SC3NEST1-R: 5´ ATC AGG TTT ATC CAT TGG TTG G 3´

Es ist für alle Ansätze entionisiertes Wasser einzusetzen.

Durchführung

- die Template-Zugabe erfolgt unter der Box
 - mit Einmalhandschuhen arbeiten
 - Primer vorverdünnen: Stammlösung 100pmol/µl, Verdünnung 1:5 auf 20pmol/µl mit Wasser
 - DNA vorverdünnen: entsprechend der photometrischen Messung auf 10ng DNA/µl einstellen
- a) Durchführung der Mollicutes-spezifischen PCR mit dem PCR Mycoplasma Test Kit II:
- jeweils 19 µl H₂O und 5 µl Promokine-Reaction-Mix in PCR-Tubes vorlegen
 - Template: je 1 µl DNA-Extrakt der Probe auf 10 ng / µl eingestellt oder unverdünnt
 - Negativkontrolle: 1 µl H₂O
 - Positivkontrolle: 0,5 µl der Positive Template Control (im Kit) und 0,5 µl H₂O
 - vortexen, kurz abzentrifugieren und in den vorprogrammierten Cycler stellen

Temperaturprofil im Thermocycler:

30 s 94 °C

30 s 94 °C

120 s 60 °C

60 s 72 °C

300 s 72°C

} → 35 x

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

b) Durchführung der Mycoides-Cluster-spezifischen PCR

5-Prime-DNA Polymerase-System (z.B. VWR International GmbH)

25 µl Reaktionsvolumen

Mastermix

	Reaktionsvolumen (µl)	Endkonzentration
H ₂ O	19,9	-
Puffer 10x	2,5	1x
MgCl ₂ (im Puffer)	-	1,5 mM - 2 mM
dNTP (10 mM)	0,5	200 µM
F-REAP (20 pmol)	0,5	400 µM
R-REAP (20 pmol)	0,5	400 µM
Polymerase (5 U/µl)	0,1	0,5 U

- jeweils 24 µl Mastermix in PCR-Tubes vorlegen
- Template: je 1 µl DNA-Extrakt der Probe auf 10 ng/µl eingestellt oder unverdünnt
- Negativkontrolle: 1 µl H₂O
- Positivkontrolle: 1 µl (10 ng / µl) *M. mycoides* subsp. *mycoides* Typstamm PG1
- vortexen, kurz abzentrifugieren und in den vorprogrammierten Cycler stellen

Temperaturprofil im Thermocycler:

120 s 96 °C

30 s 96 °C

30 s 59 °C

60 s 68 °C

120 s 68°C

} → 35 x

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

c) Durchführung der Mmm-spezifischen PCR

5-Prime-DNA Polymerase-System

25 µl Reaktionsvolumen

Mastermix

	Reaktionsvolumen (µl)	Endkonzentration
H ₂ O	19,9	-
Puffer 10x	2,5	1x
MgCl ₂ (im Puffer)	-	1,5 mM - 2 mM
dNTP (10 mM)	0,5	200 µM
SC3NEST1-L (20 pmol)	0,5	400 µM
SC3NEST1-L (20 pmol)	0,5	400 µM
Polymerase (5 U/µl)	0,1	0,5 U

- jeweils 24 µl Mastermix in PCR-Tubes vorlegen
- Template: je 1 µl DNA-Extrakt der Probe auf 10 ng / µl eingestellt oder unverdünnt
- Negativkontrolle: 1 µl H₂O
- Positivkontrolle: 1 µl (10 ng / µl) *Mmm* Typstamm PG1

Temperaturprofil im Thermocycler:

120 s 96 °C

30 s 96 °C

30 s 52 °C

40 s 68 °C

120 s 68°C

} → 35 x

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Geräte, Materialien und Reagenzien

- Elektrophoresekammer (z. B. Biometra, Biozym)
- Stromversorgungsgerät
- Mikrowelle
- Gel-Auswertesystem (z. B. Bio Imaging System von Syngene)
- Maßkolben (1 l)
- Erlenmeyerkolben (300 ml, 500 ml)
- Messzylinder (25 ml, 100 ml)
- Parafilm
- Präzisionspipetten, verschiedene Größen
- passende Tips, steril und DNase-frei (PCR-clean), z. B. Eppendorf
- Handschuhe (Nitrilhandschuhe → beständig gegenüber Ethidiumbromid)
- Agarose (PeqGold Universal Agarose von Peqlab)
- 10x TBE-Puffer
- dest. H₂O
- Ethidiumbromid (Tropfflasche, z. B. Eurobio)
- Molekulargewichtsmarker: 1 kb (100 bp + 1,5 kbp) Marker, Genaxxon, gebrauchsfertig
- Entionisiertes Wasser für alle Reaktionsansätze

Ansetzen der Lösungen

- Herstellung des Laufpuffers (1x TBE-Puffer): 100 ml 10x TBE-Puffer ad 1000 ml dest. Wasser
- Zusammensetzung des Agarose-Gels:

Gelkonzentration	1,5 %
Volumen	100 ml
Agarose	1g
dest. Wasser	90 ml
10x TBE-Puffer	10 ml
Ethidiumbromid	2 Tr.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Durchführung

- Elektrophoresekammer zusammensetzen, passenden Kamm auswählen
- Agarose einwiegen, mit 1 x TBE-Puffer im Erlenmeyerkolben lösen
- in der Mikrowelle bei 600 W zum Kochen bringen, ca. 30 s kochen
- Ethidiumbromid zugeben, Kolben vorsichtig schwenken
- zügig und luftblasenfrei in die Elektrophoresekammer gießen, etwa 0,4-0,6 cm dick
- und mind. 1 h polymerisieren lassen
- Kamm herausziehen, Laufpuffer in die Elektrophoresekammer füllen, bis der Puffer ca. 0,5 cm über dem Gel steht
- je 1 µl Probenpuffer mit 5 µl Probe auf Parafilm mischen und in die Slots pipettieren
- Laufdauer und einzustellende Spannung sind abhängig von Größe und Dicke des Gels und der Beschaffenheit der Kammer → Hinweise des Herstellers beachten
- Spannung liegt zwischen 80 und 150 V, die Dauer des Laufes zwischen 30 min und 2 h
- Faustregel für einzustellende Spannung: 5 V/cm Elektrodenabstand
- die Bromphenolblau-Front sollte mindestens zur Hälfte des Gels gewandert sein; bei schlechtem Trennergebnis kann das Gel nochmals in die Kammer gelegt und die Proben weiter getrennt werden, um eine gleichmäßige Verteilung des Ethidiumbromids im Gel zu erreichen (wandert entgegengesetzt zur DNA), kann dem Laufpuffer 0,5 mg/l Ethidiumbromid zugesetzt werden (für einen gleichmäßigen und klaren Hintergrund auf dem Gel)
- das Gel wird unter UV-Licht mit Hilfe eines geeigneten Gel-Auswertesystems analysiert und dokumentiert

Ergebnis und Kontrolle

Im UV-Licht sind bei positiven Reaktionen spezifische Banden zu erkennen:

- a) für die *Mollicutes*-spezifische PCR: 270 bp
- b) für die *Mycoides*-Cluster-spezifische PCR: 785 bp
- c) für die *Mmm*-spezifische PCR: 717 bp

Bei jedem Lauf muss die Positivkontrolle (DNA vom Typstamm *Mmm* PG1) ebenfalls die spezifische Bande aufweisen, während die Negativkontrolle keine Bande zeigen darf. Sollte die Negativkontrolle PCR-positiv sein, ist das gesamte Amplifikationsexperiment mit frischen Reagenzien zu wiederholen.

Eine diagnostische Probe ist *Mmm*-positiv, wenn alle drei Systeme, oder mindestens die *Mmm*-spezifische und eine der beiden anderen PCRs ein spezifisches Amplikon zeigen.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

3.2.4 TaqMan Real-Time-PCR

Geräte, Materialien und Reagenzien

- Real-Time-Thermocycler, z. B. Mx3000P (Agilent, Böblingen; früher Stratagene)
- Vortexer, Tischzentrifuge
- Präzisionspipetten, verschiedene Größen
- passende Tips, steril und DNase-frei (PCR-clean)
- Handschuhe
- Eppendorf-Tubes, 0,2 ml, bzw. Platten, steril
- QuantiFast® Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden)
- Primer (z.B. von Eurofins MWG Operon, Ebersbach) und Sonden (z.B. von TIBMolbiol, Berlin):

Tabelle 1: Primer und Sonden

Target	Primer/Sonden	Sequenz (5'-3')
MSC_1046 (IppQ)	MSC_1046-S (IppQ-S)	ATCAAGATATTTTCGAGTTGAAATGTAAG
	MSC_1046-R2 (IppQ-R2)	TGTATATTTTTTAGATTTCAATCTGAAAGTG
	MSC_1046-TM1 (IppQ-TM1)	FAM-TTTCAGCTCGATAAAACATATTT-BBQ1
MSC_0136 (IppD)	MSC_0136-F (DF)	AACACAAAAAACCGAACAGCCT
	MSC_0136-R (DR)	AGCTTATCAGGAACTTTTTTAACGTA
	MSC_0136-TM (DTM)	Cy5-TGAGATAGTTCAAATTGGCTTT-BBQ1
IC	EGFP-1F	GACCACTACCAGCAGAACAC
	EGFP-10R	CTTGTACAGCTCGTCCATGC
	EGFP-Hex	HEX-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1

IC Template: Lösung: 2x10⁴ Kopien EGFP-Plasmid, 0,25 µl je 25 µl Reaktionsansatz

(Direktbezug von Dr. B. Hoffmann, Riems oder Kauf von Intype IC-DNA, Labor Diagnostik Leipzig)

Es ist für alle Ansätze entionisiertes Wasser einzusetzen.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Durchführung

- Mastermixe im Geb. 023/R. 230 unter der PCR-Box pipettieren
- die Template-Zugabe erfolgt unter der Box im Geb. 023/ R. 222
- mit Einmalhandschuhen arbeiten
- *Mmm*-spezifische Primer und Sonden vorverdünnen: Stammlösung 100 pmol/μl, Verdünnung 1:10 auf 10pmol/μl mit Wasser
- Herstellung des IC2-Mixes (beinhaltet Primer und Sonde für Kontrolltarget EGFP): 100 μl Primer EGFP1-F (100 pmol/μl), 100 μl Primer EGFP10-R (100pmol/μl), 50 μl Sonde EGFP-HEX (100 pmol/μl), mit H₂O auf 1 ml auffüllen, aliquotieren
- PCR-Ansatz 25 μl:
 - 3,75 μl H₂O
 - 12,5 μl QuantiTect Mastermix
 - 1 μl Primer IppQ-S (Endkonzentration 400 nM)
 - 1 μl Primer IppQ-R2 (Endkonzentration 400 nM)
 - 1 μl Primer DF (Endkonzentration 400 nM)
 - 1 μl Primer DR (Endkonzentration 400 nM)
 - 0,75 μl Sonde IppQ-TM1 (Endkonzentration 300 nM)
 - 0,75 μl Sonde DTM (Endkonzentration 300 nM)
 - 2 μl IC2Mix
 - 0,25 μl IC2 Template
 - 1 μl Proben-Template
- Mitführen einer Standardreihe (Doppelbestimmung) bei jedem Lauf: *Mmm*-DNA in Konzentrationen von 1 fg bis zu 1 ng (spektrophotometrisch bestimmt, ist gleichzeitig Positivkontrolle)
- Doppelbestimmung für jede Probe
- Negativkontrollen als Doppelbestimmung mitführen, bei hohem Probenaufkommen aller 20-30 Reaktionen wiederholen
- beide *Mmm*-spezifischen Amplifikationen können auch einzeln oder unabhängig voneinander durchgeführt werden, die fehlenden Volumina sind dann mit H₂O zu ergänzen

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	
B	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	
C	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	
D	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	
E	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	
F	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	
G	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	
H	Standard REF 1.00e-001 1.00e-001	Standard REF 1.00e-001 1.00e-001	Standard REF 1.00e+000 1.00e+000	Standard REF 1.00e+000 1.00e+000	Standard REF 1.00e+001 1.00e+001	Standard REF 1.00e+001 1.00e+001	Standard REF 1.00e+002 1.00e+002	Standard REF 1.00e+002 1.00e+002	Standard REF 1.00e+002 1.00e+002	Standard REF 1.00e+003 1.00e+003	Standard REF 1.00e+003 1.00e+003	Standard REF 1.00e+004 1.00e+004	Standard REF 1.00e+004 1.00e+004

Abb.: Schema zur Belegung der Mikrotiterplatte

Standard = Verdünnungsreihe der Positivkontrolle,, Unknown - Probe, NTC - No Template Control (Negativkontrolle)

Temperaturprofil in Thermocycler Stratagene Mx3000P

5 min	95 °C	} 45 x
20 s	95 °C	
45 s	57 °C	
45 s	68 °C	

Ergebnis und Kontrolle

- Die Testergebnisse werden mit Hilfe der Stratagene Software MxPro4 ausgewertet. Ein positiver Befund liegt vor, wenn die Ct-Werte (Schnittpunkt von Amplifikationskurve und Schwellenwert) in beiden Ansätzen einer Probe sowohl für das Target IppQ (Signal FAM) als auch für das Target IppD (Signal Cy5) kleiner als 39 sind. Da der IppD-Assay eine etwas höhere Sensitivität als der IppQ-Assay besitzt, ist es bei geringem Erregergehalt möglich, dass der Ct-Wert für IppQ größer als 39 ist. Sind die Ct-Werte beider IppD-Ansätze dann aber <39, so ist die Probe positiv. Ist der Ct-Wert eines Ansatzes >39 und der des zweiten Ansatzes <39, so ist diese Probe fraglich und die Real-Time-PCR-Analyse ist für diese Probe zu wiederholen. Proben, die in beiden Ansätzen der zwei Targets Ct-Werte >39 zeigen, sind als negativ zu betrachten (s. Tabelle 2).

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

- Die Amplifikation der internen Kontrolle (IC) hilft abzuschätzen, ob Inhibitoren im Reaktionsmix den Ablauf der PCR beeinträchtigen. Die Ct-Werte der IC (Signal HEX) sollen sich in einem Bereich von 26,0 bis 32,0 bewegen und untereinander relativ einheitlich sein (Unterschied zwischen den Proben eines Laufes max. 2 Einheiten). Sobald eine als *Mmm*-negativ beurteilte Probe einen zu hohen Ct-Wert der IC zeigt, ist diese zu wiederholen. Eine Probenserie ist außerdem zu wiederholen, wenn mindestens eine NTC einen Ct-Wert <40 zeigt.

Tabelle 2: Richtlinie zur Bewertung der Ergebnisse

Ct-Wert des IppQ-Signals (FAM)	Ct-Wert des IppD-Signals (Cy5)	Bewertung
2x <39	2x <39	positiv
2x > 39, < 43	2x <39	positiv
1x <39, 1x >39	1x <39, 1x >39	fraglich positiv (Wiederholung)
2x >39	2x >39	negativ

Angaben zur Messunsicherheit

Die Intra-Assay-Varianzkoeffizienten liegen für den IppD-Assay zwischen 1,1 und 2,6 % und für den IppQ-Assay zwischen 0,7 und 2,3 %. Als Inter-Assay-Varianzkoeffizienten wurden für den IppD-Assay 1,1-2,4 % und für den IppQ-Assay 0,8-2,9 % ermittelt. Die sich Daraus ergebenden Messunsicherheiten beeinflussen nicht die Aussagekraft der PCR-Ergebnisse.

Ansonsten ergeben sich Messunsicherheiten wie allen vergleichbaren Methoden z. B. aus gerätespezifischen Ungenauigkeiten hinsichtlich abweichender Temperaturverteilungen innerhalb des Thermoblocks, durch Abweichungen innerhalb der zulässigen Toleranzbereiche bei allen Pipettierschritten sowie durch unbekannte Inhibitoren im Probenansatz. Durch das Mitführen von allen erforderlichen Kontrollen (siehe 3.2. Durchführung) und regelmäßiger Überprüfung bzw. Kalibrierung der verwendeten Gerätschaften können die zu erwartenden Abweichungen bzw. Messunsicherheiten in einem vertretbaren Rahmen gehalten werden und beeinflussen ebenfalls nicht die Aussagekraft der Ergebnisse aus der Real-Time-PCR.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

3.3 Antikörpernachweis durch Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die KBR für die Lungenseuche wird in der Regel zuerst von den Landesbehörden festgelegten staatlichen Untersuchungsämtern durchgeführt werden (Anhang 1). Die notwendigen Reagenzien (Antigen, positive und negative Kontrollseren) werden vom nationalen Referenzlabor in Jena für die aufgeführten Untersuchungsämter zur Verfügung gestellt.

Zur Feststellung des Verdachts eines Lungenseucheausbruchs bzw. zur Eingrenzung des Kreises verdächtiger Tiere kann die jeweilige hauseigene Arbeitsvorschrift verwendet werden.

Nachfolgend wird der prinzipielle Ablauf am Beispiel der von der OIE empfohlenen Mikromethode dargestellt, welche auf das Verfahren nach Campbell und Turner (1953) zurückgeht.

Geräte/Gebrauchsmaterialien

- Zentrifuge, Wasserbad $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$; Wasserbad $58\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$;
- Waage; heizbarer Magnetrührer; Kühlschrank $6\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$; Gefrierschrank $-20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$
- Ablesespiegel für Mikrotiterplatten; Bechergläser (30 ml bis 800 ml);
- Messzylinder (50 bis 250 ml); Kulturröhrchen (12ml);
- Zentrifugenröhrchen (12 ml); Ständer für Röhrchen, Klebefolie zum Abkleben der Mikrotiterplatten, Messpipetten (1, 5 und 10 ml), Kolbenhubpipetten (10 bis 1000 μl), entsprechende Pipettenspitzen, Transferpette 8-Kanal (20 - 100 μl), Multistepper 8-Kanal 25 - 125 μl , Pipettierhilfe
- Erlenmeyerkolben, Stehkolben, Bechergläser, Mikrotiterplatten (U-Form, 8x12 Cups), feuchte Kammer

Reagenzien/Rezepturen

Alseverlösung für Hammelerythrozyten:

Dextrose	18,66 g
NaCl	4,18 g
Natriumcitrat	8,00 g
Aqua bidest.	1000 ml

nach gründlichem Mischen für 20 min in den Dampftopf geben

Veronal-Puffer (Veronal - buffered diluent = VBD):

2000 ml Konzentrat, 5:1

NaCl	83,00 g
5,5 - Diäthylbarbitursäure Natriumsalz	10,19 g
Aqua bidest.	800 ml

Aqua bidest. zum Kochen bringen und mit beheizbaren Magnetrührer Substanzen darin lösen

34,58 ml 1n HCl über einen Scheidetrichter oder langsam mit einer Pipette tropfenweise hinzugeben, bei Ausfall von Salzen noch etwas Aqua bidest zugeben

tropfenweise 5 ml Stammlösung hinzugeben

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Stammlösung:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	20,3 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	4,4 g
in Aqua bidest.	100 ml

10 ml der konzentrierten VBD werden 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt und auf einen pH-Wert zwischen 7,3 bis 7,5 überprüft. Sollte der pH-Wert außerhalb dieser Grenzen liegen, muss ein Neuansatz erfolgen. Die konzentrierte Lösung wird in 200 ml Portionen abgefüllt und bei -20 °C aufbewahrt, die bei Bedarf 1:5 verdünnt werden können.

Komplement:

(z. B. Fa. Virion), jede Charge ist vor erstmaligem Gebrauch auszuwerten (siehe dort)

Ambozeptor:

(z. B. Fa. Virion), jede Charge ist vor erstmaligem Gebrauch auszuwerten (siehe dort). Bei Titerverlust empfiehlt sich eine erneute Auswertung.

Antigene sowie negative und positive Kontrollseren:

werden im nationalen Referenzlabor hergestellt und den Untersuchungsämtern kostenlos zur Verfügung gestellt

Hammelblut:

- Hammelblut 37,5 ml
- Alseverlösung 62,5 ml

Eine sterilisierte Schraubflasche mit einer Markierung bei 100 ml wird mit Alseverlösung befüllt und mit Hammelblut direkt aus der Kanüle auf 100 ml aufgefüllt. Das Blut wird aus der Vena jugularis gewonnen. Um Kontaminationen vorzubeugen, gibt man 200000 Internat. Einheiten/l Penicillin G hinzu. Das so gewonnene Hammelblut hält sich bei Kühlschranktemperatur etwa 10 bis 14 Tage. Für den Einsatz im Hämolytischen System muss es jedoch mindestens 24 h alt sein.

Alternativ kann eine 1%ige Erythrozytensuspension der Firma VIRION/SERION verwendet werden.

Hämolytisches System (HS):

- Hammelblut in Alseverlösung bei 900 x g für 10 Minuten zentrifugieren
- 3- bis 5x waschen in VBD (bis Überstand wasserklar ist), dazwischen jeweils 10 min zentrifugieren bei 900 x g
- herstellen einer 2%igen Hammelerythrozytensuspension mit VBD
- zum Gebrauch wird diese mit gleichem Volumen der Ambozeptor-Gebrauchsverdünnung gemischt und 15 min bei 37 °C ± 1 °C stehen gelassen (Sensibilisierung)
- Bei getrennter Aufbewahrung von Erythrozytensuspension und Ambozeptorverdünnung können diese bis zu 48 h nach Herstellung verwendet werden.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Durchführung

Anmerkung:

Alle Reagenzien sind vor der Verwendung auf Raumtemperatur zu erwärmen.

Ambozeptorauswertung

Die Ambozeptorauswertung sollte bei Bedarf durchgeführt werden, zumindest bei Verwendung einer neuen Charge von Ambozeptor.

Ansatz folgender geometrischer Verdünnungsreihen des Ambozeptors:

Röhrchen	1	2	3	:	:	:	n
Reihe A	1:500	1:1000	1:2000	:	:	:	1:32000
Reihe B	1:750	1:1500	1:3000	:	:	:	1:24000

- Ausgangsverdünnung 1:500 (z. B. 0.1 ml Ambozeptor + 49,9 ml VBD) herstellen
- Vorlage von 5 ml VBD für die Reihe A ab Röhrchen 2, für Reihe B ab Röhrchen 1
- für die Reihe A dem 1. und 2. Röhrchen 5 ml Ambozeptorverdünnung 1:500 zufügen und ab Röhrchen 2 durch fortlaufendes Überpipettieren von jeweils 5 ml die weiteren Verdünnungen anlegen
- für Reihe B dem 1. Röhrchen 10 ml Ambozeptorverdünnung 1:500 zufügen und durch fortlaufendes Überpipettieren von jeweils 5 ml weitere Verdünnungen anlegen
- beide Titrationsreihen zu einer Verdünnungsreihe zusammenfügen

Ansatzschema der Ambozeptorauswertung

Röhrchen	Amb.-Verd. (0,5 ml)	VBD (ml)	Erythr.-Susp. (ml)	Kompl. Verd. 1:20 (ml)
1	1:500	1,0	0,5	0,5
2	1:750	1,0	0,5	0,5
3	1:1000	1,0	0,5	0,5
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:
n	1:32000	1,0	0,5	0,5

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Kontrollen

- a) Erythrozytenkontrolle: 0,5 ml Erythrozytensuspension
0,2 ml VBD
- b) Komplementkontrolle: 0,5 ml Erythrozytensuspension
0,5 ml Komplement 1:20
1,5 ml VBD
- c) Ambozeptorkontrolle: 0,5 ml Erythrozytensuspension
0,5 ml Ambozeptorverdünnung
1,5 ml VBD

schütteln, Inkubation 30 Minuten bei 37 °C ± 1 °C im Wasserbad

Auswertung

Ermittelt wird die höchste Ambozeptorverdünnung, die noch eine komplette Hämolyse bewirkt. Sie gilt als Ambozeptoreinheit. Die Gebrauchsverdünnung beträgt 4 Einheiten, also die vierfache Konzentration.

Beispiel: 1 Ambozeptoreinheit = 1:6000
Gebrauchsverdünnung = 1:1500

Die Kontrollen dürfen keine Hämolyse aufweisen.

Komplementauswertung

Die Komplementauswertung dient der Feststellung der Komplementgebrauchsdosis für den Hauptversuch in Gegenwart der entsprechenden Antigengebrauchsverdünnung. Zum Vergleich wird eine zweite Reihe angesetzt, bei der das Antigenvolumen durch VBD ersetzt ist.

Das Komplement wird in 8 Konzentrationsstufen in der Wärmebindung geprüft. In der folgenden Tabelle ist die Herstellung der 8 Verdünnungsstufen dargestellt:

		Komplementkonzentration (%)							
		0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	2,5	4,0
Kompl. 1:10	(ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
VBD	(ml)	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2

Die weiteren Arbeitsschritte sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

		Reihe 1	Reihe 2
Komplement je Verd.-Stufe	(ml)	0,5	0,5
Antigenverdünnung	(ml)	-	0,5
VBD	(ml)	1,0	0,5

- schütteln, Wasserbad 60 min bei 37 °C ± 1 °C

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

HS	(ml)	1,0	1,0
----	------	-----	-----

-schütteln, Wasserbad 30 min bei 37 °C ± 1 °C

Auswertung

Es wird das Röhrchen mit der niedrigsten Komplementkonzentration bestimmt, das eine komplette Hämolyse aufweist. Die Gebrauchsverdünnung für den Hauptversuch ist die folgende höhere Konzentration

Beispielkomplette Hämolyse = 2,0 %
 Gebrauchskonzentration = 2,5 %

Hauptversuch

Kontroll- und Probandenserien in einer Verdünnung von 1:5 im Wasserbad bei 58 °C ± 1 °C inaktivieren (30 bis 50 min)

Trennlinie zwischen Cup 10 und 11 von A bis H ziehen

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Arbeitsschritte aufgeführt:

Arbeitsschritte		Cup								
		1	2	3	:	:	:	10	11	12
1. VBD	(µl)	-	25	25	:	:	:	25	-	25
2. Serum	(µl)	50	-	-	:	:	:	-	50	-

3. Titration des Serums von 1 nach 10 und von 11 nach 12 durch Übertragung von 25 µl und verwerfen von 25 µl aus den Cups 10 und 12
 Titration der Komplementkontrollen (siehe bei Kontrollen)
 beim Titrieren mind. 3 x mischen durch Aufziehen und Abgeben mit der Pipette!

4. VBD		-	-	-	:	:	:	-	25	25
5. Antigen	(µl)	25	25	25	:	:	:	25	-	-
6. Kompl.	(µl)	25	25	25	:	:	:	25	25	25

7. schütteln und abgedeckte Platte 18 bis 24 h bei 5 °C ± 3 °C inkubieren (Kältebindung), danach die Platte wieder auf Raumtemperatur erwärmen oder für 60 min bei 37 °C ± 1 °C im Wasserbad oder im Brutschrank in einer feuchten Kammer inkubieren (Wärmebindung)
 Achtung: auf dem Antigen ist vermerkt, welche Inkubationsvariante anzuwenden ist

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

8. HS	(μ l)	50	50	50	:	:	:	50	50	50
-------	------------	----	----	----	---	---	---	----	----	----

Schütteln, abdecken und Inkubation 20 - 30 min bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ im Wasserbad oder im Brutschrank in einer feuchten Kammer.

Hinweis:

Für die Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer muss man die Hämolyse in den Komplementkontrollen verfolgen. Die Inkubation wird nur solange fortgesetzt, bis die Cups mit 2 und 1 Komplementeinheiten 100 % Hämolyse zeigen, bei 0,5 und 0,25 Komplementeinheiten darf keine Hämolyse auftreten.

10. Platte entweder 30 min bis 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen oder für 5 min bei 900 x g abzentrifugieren (Erythrozytensedimentation)

11. Auswertung mit Spiegel

Kontrollsystem und Interpretation der Ergebnisse

Das Ablesen der Reaktionsstärke je Verdünnungsstufe erfolgt nach dem Grad der Hämolyse und der Größe des Erythrozytensedimentes (Knopfbildung) im Vergleich zur Kontrolle des Hämolytischen Systems:

100 % Hämolyse	=	negativ	=	0 % Erythrozytensediment
75 % Hämolyse	=	+	=	25 % Erythrozytensediment
50 % Hämolyse	=	++	=	50 % Erythrozytensediment
25 % Hämolyse	=	+++	=	75 % Erythrozytensediment
0 % Hämolyse	=	++++	=	100 % Erythrozytensediment

Bei der Durchführung des Hauptversuches sind jeweils folgende Kontrollansätze mitzuführen:

Kontrolle der antikomplementären Wirkung (Eigenhemmung) jedes Serums (Serumkontrolle)

Serumverdünnung	25 μ l
VBD	25 μ l
Komplement	25 μ l
HS	50 μ l
Soll-Ergebnis	100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

Von Eigenhemmung spricht man bei fehlender Hämolyse (mit Erythrozytensediment).

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Bei Auftreten von Eigenhemmung empfiehlt sich folgende Vorbehandlung der entsprechenden Seren mit Komplement:

- Serum (unverdünnt) 75 µl
- Komplement (unverdünnt) 25 µl
- 30 min bei 37 °C ± 1 °C im Wasserbad inkubieren
- VBD 900 µl
- 30 min bei 58 °C im Wasserbad inkubieren

Hinweis:

Nicht bei allen Seren kann durch diese Vorbehandlung Eigenhemmung vermieden werden. In solchen Fällen muss die Untersuchung mit einem erneut von diesem Tier gewonnenen Serum wiederholt werden.

Antigenkontrolle (AG)

VBD	25 µl
Antigen	25 µl
Komplement	25 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

Komplementkontrolle

Für die Komplementkontrolle werden folgende Konzentrationen verwendet: die zweifache, die einfache, die 0,5-fache und die 0,25-fache Konzentration der in der Komplementauswertung ermittelten Konzentration (\triangleq Komplementeinheiten von 2; 1; 0,5 und 0,25). Die entsprechenden Verdünnungen können auch auf der Platte durch Überpipettieren von jeweils 25 µl erzeugt werden (siehe 3. Titration des Serums).

VBD	50 µl
Komplementverd.	25 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	bei Komplementeinheiten von 2 und 1 = 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment bei 0,5 und 0,25 Komplementeinheiten = 0 % Hämolyse (100 % Erythrozytensediment)

Kontrolle des Hämolytischen Systems (HS)

VBD	75 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	0 % Hämolyse, 100 % Erythrozytensediment

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Positives Kontrollserum (pos. KS)

Serumverdünnung	25 µl
Antigen	25 µl
Komplement	25 µl
HS	50 µl

Soll-Ergebnis Der ermittelte Titer muss dem für das positive Kontrollserum angegebenen Titer entsprechen.

Negatives Kontrollserum (neg. KS)

Serumverdünnung	25 µl
Antigen	25 µl
Komplement	25 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

Beispiel für Plattenbelegung

		Probenverdünnung										Serumkontrollen	
Reihe	Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Probenbezeichnung	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5	1:10
A	a												
B	b												
C	c												
D	d												
E	e												
F	pos. KS												
G	neg. KS												
H	Kontrollen	AG	AG	HS	HS	2	1	0,5	0,25				
		Komplementeinheiten											

Laut OIE-Manual ist ein Ergebnis bei 1:10 (++++) als positiv zu betrachten. 1:10+ bis 1:10+++ gelten als fraglich.

Das negative Serum darf in der Verdünnung 1:5 keine Reaktion zeigen.

Das Ergebnis ist umgehend dem zuständigen Veterinäramt zu melden.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Hinweise:

Alternativ können weitere kommerziell verfügbare Reagenzien verwendet werden (Hammelerythrozyten, VBD).

Das NRL organisiert regelmäßig Ringtests für die KBR. Die durch die Bundesländer ausgewählten staatlichen Untersuchungsämter (Anhang 1) sind verpflichtet, an diesen Ringtests teilzunehmen. Das Referenzlabor teilt die Ergebnisse den teilnehmenden Labors mit und führt eine Wertung durch. Bei unververtretbaren Abweichungen ist den entsprechenden Landesbehörden darüber Mitteilung zu machen. Die Ursachen für die entstandenen Abweichungen sind gemeinsam mit dem Referenzlabor abzuklären und abzustellen. Der KBR-Ringversuch muss anschließend vom entsprechenden Labor wiederholt werden.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

4. Anhang

4.1 Liste der von den Landes-Veterinärbehörden festgelegten Untersuchungsämter für die Lungenseuche-KBR

Bundesland	Untersuchungsämter
Baden-Württemberg	Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf - Diagnostikzentrum - Löwenbreitestr. 18/20 88326 Aulendorf Tel.: 07525 942-0 Fax: 07525 942-200 E-Mail: Poststelle@stuaau.bwl.de
	Chemisches- und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart Schaflandstr. 3/2 Sitz Fellbach 70736 Fellbach Tel.: 0711 3426 - 1727 Fax: 0711 588176 E-Mail: Poststelle@CVUAS.BWL.DE
Bayern	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit - Dienststelle Oberschleißheim Veterinärstr. 2 85764 Oberschleißheim Tel.: 09131 6808-0 Fax: 09131 6808-5425 E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit - Dienststelle Erlangen Eggenreuther Weg 43 91058 Erlangen Tel.: 09131 6808-0 Fax: 09131 6808-2102 E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Bundesland	Untersuchungsämter
Berlin-Brandenburg	Landeslabor Berlin-Brandenburg Invalidenstr. 60 10557 Berlin Tel.: 030 39784-30 Fax 030 39784-667 E-Mail: poststelle@landeslabor-bbb.de
Berlin-Brandenburg	Landeslabor Berlin-Brandenburg Abteilung III: Tierseuchen-, Zoonosen-, Infektionsdiagnostik Gerhard-Neumann-Str. 2-3 15236 Frankfurt (Oder) Tel.: 0335 5217-2100 Fax: 0335 5217-2719 E-Mail: poststelle@landeslabor-bbb.de
Hessen	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) Hauptsitz Schubertstr. 60 35392 Gießen Tel.: 0641 4800-555 Fax: 0641 4800-5900 E-Mail: poststelle@lhl.hessen.de
Mecklenburg-Vorpommern	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V) Thierfelder Str. 18/19 18059 Rostock Tel.: 0381 4035-0 Fax: 0381 4001510 E-Mail: poststelle@lalif.mvnet.de
Niedersachsen	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) Veterinärinstitut Hannover Eintrachtweg 17 30173 Hannover Tel.: 0511 28897-0 Fax: 0511 28897-299 E-Mail: poststelle.vi-h@laves.niedersachsen.de

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Bundesland	Untersuchungsämter
Nordrhein-Westfalen	<p>Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper Deutscher Ring 100 47798 Krefeld</p> <p>Tel.: 02151 849-0 Fax: 02151 849-4042 E-Mail: poststelle@cvua-rrw.de</p>
Rheinland-Pfalz	<p>Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz Institut für Tierseuchendiagnostik (ITSD) Blücherstr. 34 56073 Koblenz</p> <p>Tel.: 0261 9149-599 Fax: 0261 9149-55574 E-Mail: poststelle.its@lua.rlp.de</p>
Saarland	<p>Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz Abteilung D - Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungen Konrad-Zuse-Straße 11 66115 Saarbrücken</p> <p>Tel.: 0681 9978-0 Fax: 0681 9978-4499 E-Mail: poststelle@lgv.saarland.de</p>
Sachsen	<p>Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen (LUA) Sitz Dresden - Standort Leipzig Bahnhofstr. 58-60 04158 Leipzig</p> <p>Tel: 0351 81444900 Fax: 0351 81444920 E-Mail: poststelle@lua.sms.sachsen.de</p>
Sachsen-Anhalt	<p>Landesamt für Verbraucherschutz des Landes Sachsen-Anhalt Fachbereich 4 Haferbreiter Weg 132-135 39576 Stendal</p> <p>Tel.: 03931 631-0 Fax: 03931 631-153 E-Mail: FB4@lav.ms.sachsen-anhalt.de</p>

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Bundesland	Untersuchungsämter
Schleswig-Holstein	Landeslabor Schleswig-Holstein Geschäftsbereich 2 - Veterinärwesen Max-Eyth-Str. 5 24537 Neumünster Tel.: 04321 904-5 Fax: 04321 904-619 E-Mail: Info@lvua-sh.de
Thüringen	Thüringer Landesamt Verbraucherschutz (TLV), Abteilung 5 - Tiergesundheit und Tierschutz Tennstedter Str. 8/9 99947 Bad Langensalza Tel.: 0361 37743-500 Fax: 0361 37743-050 E-Mail: Poststelle@tlv.thueringen.de

4.2 Medium B-Bouillon

2,45 g Heart infusion broth (Difco)

+ 90,0 ml Aqua bidest.

Autoklavieren 20 min bei 121 °C

steril filtriert aseptisch hinzugeben:

20,0 ml Pferdeserum

10,0 ml Frischhefeextrakt*, 25%ig

1,2 ml Calf thymus DNA (von Sigma oder Difco), 0,2%ig

1,0 ml Thalliumacetat, 1%ige Lösung

pH-Wert 7,8 einstellen

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

4.3 Medium B-Agar

3,60 g Heart infusion agar (von Difco)

+ 90,0 ml Aqua bidest.

Autoklavieren 20 min bei 121 °C

nach Abkühlung auf 50 °C steril filtriert aseptisch hinzufügen:

20,0 ml Pferdeserum

10,0 ml Frischhefeextrakt*, 25%ig

1,2 ml Calf thymus DNA (von Sigma oder Difco), 0,2%ig

pH-Wert 7,8 einstellen

*Frischhefeextrakt:

250 g frische Bäckerhefe

+ 1000 ml Aqua bidest.

Suspension für 15 min kochen

Zentrifugieren 15 min bei 250 x g

Sterilfiltrieren

zu 10 ml-Mengen abfüllen

Aufbewahrung bei -20 °C (maximal 2 Monate)

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, www.fli.bund.de