FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methodensammlung

Tollwut

(Infektionen mit Lyssaviren)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Erreger der Tollwut sind Einzelstrang-RNA-Viren negativer Polarität, die zum Genus Lyssavirus, der Familie der *Rhabdoviridae* der Ordnung *Mononegavirales* gehören (siehe Tabelle). Das Rabies Virus (RABV) ist der Erreger der weltweit vorkommenden „klassischen Tollwut“, ~~die weltweit vorkommt und bei der~~für welche Mesokarnivore (Hund, Fuchs, Coyote, Waschbär, Marderhund, Skunk, Mangusten) sowie in Amerika auch Fledermäuse die Hauptreservoire darstellen. Neben dem RABV umfasst der Genus Lyssavirus derzeit 17 weitere Lyssavirusspezies (ICTV), für die verschiedenste Fledermausarten Reservoire bilden. Einzig für das Mokolavirus und das Ikomavirus sind bislang die Reservoirspezies unbekannt. In Europa sind fünf verschiedene Fledermaus-assoziierte Lyssaviren nachgewiesen worden: (i) EBLV-1 (*Eptesicus serotinus, E. isabellinus*), (ii) EBLV-2 (*Myotis daubentoni, M. dasycneme*), (iii) WCBV (*Miniopterus schreibersi*), BBLV (*M. nattereri*) und das LLEBV (*M. schreibersi*). Die Langflügelfledermaus (*M. schreibersii*) ist in unseren Breitengraden als Durchzügler ~~bislang~~ nur ein seltener Gast, so dass die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von WCBV und LLEBV in Deutschland sehr gering ist. Spill-over Infektionen von europäischen Fledermaus-assoziierte Lyssaviren auf andere Tierarten sind sehr selten.

Virus	Abk.	Wirtsspektrum	Verbreitung
Rabies virus	RABV	Wild- und Haustiere, hämatophage und Insekten fressende Fledermäuse (Nord-, Südamerika), Mensch	Europa, Asien, Amerika, Afrika
European bat lyssavirus 1	EBLV-1	Insekten fressende Fledermäuse (*Eptesicus serotinus*, *E. isabellinus*)	Europa
European bat lyssavirus 2	EBLV-2	Insekten fressende Fledermäuse (*Myotis daubentoni*, *M. dasycneme*)	
Bokeloh bat lyssavirus	BBLV	*Myotis nattereri*	
Lleida bat lyssavirus	LLEBV	isoliert aus *Miniopterus schreibersi* (Iberische Halbinsel)	
West caucasian bat virus	WCBV	isoliert aus *Miniopterus schreibersi* (Kaukasusregion)	
Kotalahti bat lyssavirus	KBLV	Nachgewiesen in *Myotis brandtii* (Finnland)	
Lagos bat virus	LBV	Fruchtfleisch fressende Fledermäuse (Megachiroptera)	Afrika
Mokola virus	MOKV	? (isoliert aus Spitzmäusen, Nagern, Mensch, Hunde, Katzen)	
Duvenhage virus	DUVV	Insekten fressende Fledermäuse	
Shimoni bat virus	SHIBV	isoliert aus *Hipposideros commersoni*	
Ikoma virus	IKOV	? (isoliert aus der Afrikanische Zibetkatze, *Civettictis civetta*)	
Australian bat lyssavirus	ABLV	Flughunde und Insekten fressende Fledermäuse (Mega/Microchiroptera)	Australien
Aravan virus	ARAV	isoliert aus *Myotis blythi*	Asien
Khujand virus	KHUV	isoliert aus *Myotis mystacinus*	
Irkut virus	IRKV	isoliert aus *Murina leucogaster*	
Gannoruwa bat lyssavirus	GBLV	Isoliert aus *Pteropus medius* (Sri Lanka)	
Taiwanese bat lyssavirus	TWBLV	Isoliert aus *Pipistrellus javanicus* (Taiwan)	

1.2 Klinische Symptomatik

Die Inkubationszeit variiert zwischen drei Wochen bis mehreren Monaten. Bei der rasenden Wut zeigen sich folgende klinischen Symptome: Wesensveränderungen, Hypersensibilität, Aggressivität, Paralysen, Lähmungen, Speicheln, Unterkieferlähmung, Erstickungsanfälle, Festliegen. Bei der sogenannten stillen Wut gehen die Anfangssymptome schnell in Lähmungen über, ohne dass dabei Anzeichen von Hypersensibilität und Aggressivität auftreten. Die Tiere leiden unter Krämpfen und Lähmungen. Die Erkrankung führt immer zum Tod. Beim Menschen sind Aerophobie und Hydrophobie prognostisch. Bei Fledermäusen sind hauptsächlich Lähmungen und Orientierungslosigkeit beschrieben worden, aber auch aggressives Verhalten.

1.3 Differentialdiagnose

Es sind alle ZNS-Erkrankungen insbesondere Aujeszkysche Krankheit, Bornasche Krankheit, Toxoplasmose, Listeriose, Kochsalzvergiftung beim Schwein, Staupe, Fuchsenzephalitis etc. einzubeziehen. Bei Fledermäusen: Traumata; physiologische Lethargie durch Torpor oder Winterschlaf; Intoxikationen; andere infektiöse Erkrankungen.

Diagnostische Indikation

- Differentialdiagnostische Abklärung bei Tieren mit zentralnervösen Störungen bei klinischem oder epidemiologisch (z. B. Import, Kontakt zu Fledermaus) begründetem Verdacht
- Abklärungsuntersuchungen im Rahmen der post-expositionellen Prophylaxe (PEP) beim Menschen (Biskontakt, Kontakt mit Fledermäusen)
- Serologie: Verbringen von Tieren, Ein- und Ausfuhr, Begleitung von Surveillance- und Bekämpfungsprogrammen

Achtung: Fledermäuse sind streng geschützte Tierarten (EUROBATS, Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie - 92/43/EWG, Bundesartenschutzverordnung – BartSchV). Daher ist die gezielte Tötung von Fledermäusen, sei es aus dem Wunsch, eine eindeutige Diagnose zu stellen oder zur „Prävention“ bei festgestellter Tollwut innerhalb einer Kolonie, weder sinnvoll noch statthaft.

1.4 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungs-, Tiergesundheitsämter bzw. staatliche Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsämter der Bundesländer
- Nationales Referenzlabor (NRL): Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (nationales und OIE Referenzlabor für Tollwut, WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research), Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie, Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Tel. 038351 1659/1660.

1.5 Rechtsgrundlagen

- Tollwut-Verordnung in der jeweils gültigen Fassung ~~der Bekanntmachung vom 4. Oktober 2010 (BGBl. I S. 1313)~~
- Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE): ~~Rabies,~~ Chapter 8.14.~~8.13~~. Infection with rabies virus. In: OIE Terrestrial Animal Health Code, Paris, ~~2016~~2018.Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE): ~~Rabies,~~ Chapter ~~23.~~1.17. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris, ~~2016.~~ (NB: Version adopted in May 2018).
- VERORDNUNG (EG) Nr. 998/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 26. Mai 2003 über die Veterinärbedingungen für die Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken und zur Änderung der Richtlinie 92/65/EWG des Rates.
- 2000/258/EG: Entscheidung des Rates vom 20. März 2000 zur Bestimmung eines spezifischen Instituts, das für die Aufstellung der Kriterien für die Normung der serologischen Tests zur Kontrolle der Wirksamkeit der Tollwutimpfstoffe verantwortlich ist, Amtsblatt Nr. L 079 vom 30/03/2000 S. 0040 – 0042.

2. Untersuchungsmaterial

Untersuchungsmaterial Erregernachweis:

Gehirnmaterial (Ammonshorn, Cerebellum, Pons oder Medulla oblongata); Speicheldrüsen (Parotis) sind nur in Ausnahmefällen zu empfehlen (Fehlen von Gehirnmaterial) und bieten keine ausreichende diagnostische Sicherheit; Menge: ca. 1 cm^3

Versand: Gehirn, tiefgefroren (z. B. mit Trockeneis), ggf. Tierkörper
Bei Fledermäusen sollte vorzugsweise der Tierkörper mit eingesendet werden (Speziesidentifizierung)

Untersuchungsmaterial zur Kontrolle von Impfmaßnahme:

- Ca. 0,5 ml (Minimum) **Serum** zur Kontrolle von Impfmaßnahmen bei Haustieren (parenterale Immunisierung)
- Ca. 0,5 ml (Minimum) **Brusthöhlen- u. Bauchhöhlentranssudat** (nicht älter als drei Tage post mortem) zur Kontrolle von Impfmaßnahmen bei Wildtieren (orale Immunisierung).

3. Untersuchungsgang

Die Diagnose einer Lyssavirus-Infektion (Tollwut) beruht auf dem direkten Nachweis von lyssaviralem Antigen (IFT)~~im Gehirn~~, infektiösem Virus mittels Zellkultur oder ~~dem Nachweis von~~ lyssaviraler RNA (PCR) im Gehirn tollwutverdächtiger Tiere. Für die Routinediagnostik können sowohl der IFT als auch die PCR eingesetzt werden. Für den Ausschluss einer Infektion mit Lyssaviren ist ein negatives Ergebnis hinreichend.
Bei humaner Exposition ist ein positives Ergebnis in einem der drei genannten Verfahren indikativ für eine postexpositionelle Prophylaxe (PEP). ~~Letzterer erhärtet nur einen Verdacht, f~~ Für die amtliche Feststellung eines Tollwutfalles ist jedoch der Antigen- oder Virusnachweis maßgebend!

3.1 Nachweis von Lyssavirus Antigen

Der Antigennachweis erfolgt mittels direktem Immunfluoreszenztest (IFT).

Herstellung der Präparate

Es ist darauf zu achten, dass soweit möglich, jeweils stets ein Gewebestück vom Ammonshorn, Cerebellum sowie Pons oder Medulla oblongata von einem Tier auf einem Objektträger (OT) untersucht wird!
Ein gut weizenkorngroßes Gewebestück mittels Skalpellspitze oder Pinzette entnehmen und unter leichtem Druck auf fett- und fluoreszenzfreien OT unter mäßigem Druck mehrmals tupfen, so dass ein im Durchmesser etwa 1 cm großes Präparat entsteht (vorgefertigte OT benutzen).
Präparate lufttrocknen. Fixieren durch Hitze (dreimal leicht durch die offene Flamme eines Bunsenbrenners ziehen) oder 30 min in -20 °C Aceton.

Direkte Immunfluoreszenz

- Inkubation mit kommerziell erhältlichem zugelassenem FITC-Antitollwut-Konjugat (Gebrauchsverdünnung lt. Hersteller)
- OT 2 x 5 min mit Tollwut(TW)-Puffer, pH 7,8, bzw. mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer waschen, spülen in Aqua dest.,
- Präparat lufttrocknen,
- Eindecken der Präparate in isotonischen Phosphatpuffer (IP) -Glycerol (9 : 1) oder Immersionsöl
- Fluoreszenzmikroskopie bei mindestens 300-facher Vergrößerung, mäanderförmige Durchmusterung aller drei Gewebeproben

3.1 Virusisolierung in der Zellkultur

Die Virusisolierung in der Zellkultur ist ein ~~muss als~~ Bestätigungs- bzw. Abklärungstest ~~bei allen IFT-fraglichen Befunden sowie auch bei IFT-negativen Befunden mit humaner Exposition durchgeführt werden~~.

Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

- Herstellung einer 20%igen Gehirnsuspension in Medium,
- 30 min bei 4 °C absetzen lassen, zentrifugieren bei 3.000 UpM für 10 min,
- Überstand kurzfristig bei 4 °C aufbewahren, längere Lagerung bei -70 °C, nicht bei -20 °C!
- Zellen (Na42/13) in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml in Dextran-Gebrauchslösung aufnehmen, 10 min einwirken lassen,
- 0,5 ml Zellsuspension mit 0,5 ml Überstand mischen. 30 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubieren, dazwischen zwei- bis dreimal die Zellen vorsichtig aufwirbeln,
- Zellsuspension abzentrifugieren, Zellpellet in 10 ml Medium aufnehmen und 8 ml in Gewebekulturflasche (T25) sowie 2 ml in 6er- bzw. 24er-well-Platte für IFT-Kontrolle aussäen,
- Inkubation 3 - 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2,
- IFT-Kontrolle.

Mitführen einer Negativ- und Positivkontrolle. Positive Kontrolle: Zellkultur, beimpft mit positivem Untersuchungsmaterial mit bekanntem Virusgehalt in einer Konzentration, die das Auszählen der fluoreszierenden Zellen bzw. Zellgruppen erlaubt (Sensitivitätskontrolle) oder IFT-positives Gehirnmaterial.

Immunfluoreszenztechnik (IFT-Kontrolle)

- Medium absaugen, mit TW-Puffer oder PBS spülen,
- Fixierung in 80%igem Aceton oder 3%igem PFA für 30 min trocknen, Lage markieren,
- Färben mit kommerziell erhältlichem Konjugat, für 30 min bei 37 °C in feuchter Kammer,
- zweimal mit TW-Puffer spülen, Zugabe von Aqua bidest,
- Fluoreszenzmikroskopie bei ca. 300-facher, im Zweifelsfall bei 400-facher Vergrößerung, Auswertung des gesamten markierten Bereiches.

3.2 Nukleinsäurenachweis in der RT-PCR

Die RT-PCR kann zum Nachweis von RNA in Organproben (Gehirn, Speicheldrüse) oder Speichelproben genutzt werden. Aufgrund der Diversität der Lyssaviren bietet sich ein kaskadenartiger Einsatz von PCR-Assays an. Zunächst sollte eine pan-lyssa PCR eingesetzt werden, um grundsätzlich zu klären, ob eine Lyssavirusinfektion vorliegt (Hayman et al., 2011; Fischer et al., 2014). Durch die Verwendung von zwei unabhängigen Zielregionen, die sehr konserviert sind, sollte es so auch möglich sein, derzeit noch nicht beschriebene Lyssavirus-Spezies zu detektieren. In einem zweiten Schritt erfolgt die Differenzierung über speziesspezifische sondenbasierte Assays. Hierbei kann das von Wakeley et al., (2004) etablierte Verfahren oder das am FLI entwickelte multiplex System Verwendung finden (Fischer et al., 2014).
Grundsätzlich sind bei der Verwendung der hochsensitiven molekularen Diagnostik die Maßnahmen zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen zu beachten. Die Verwendung von artifiziellen Positivkontrollen wird empfohlen.

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

Generelle Arbeitsschritte sind:

- Homogenisierung des zu untersuchenden Probenmaterials,
- RNA-Extraktion (Phenol-Chloroform-Extraktion oder kommerzielle RNA-Extraktionskits)
- Amplifikation
- Analyse der ct-Werte (realtime RT-PCRs)

Am NRL für Tollwut am FLI werden hochsensitive RABV-spezifische multiplex Realtime PCRs zum Nachweis viraler RNA genutzt (Fischer *et al.*, 2014; Hoffmann *et al.*, 2010). Entsprechende Protokolle können über das NRL bezogen werden.
~~Die hochsensitive Realtime PCR ist dazu geeignet, IFT-negative (mit Personenkontakt) bzw. IFT-fragliche Befunde zu erhärten. Beachte: Gemäß TW-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. Oktober 2010 ist für die amtliche Feststellung eines Tollwutfalles jedoch der Antigen- oder Virusnachweis maßgebend!~~

3.3 Nachweis spezifischer Antikörper

Bei der Tollwut wird der indirekte (serologische) Erregernachweis nicht zur Diagnose eingesetzt, sondern weist durch Impfung induzierte Antikörper nach. Der Rapid Fluorescence Focus Inhibition Test (RFFIT) ist eine fluoreszenzserologische Methode zur Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern gegen Tollwut. Der Test wird im Zusammenhang mit der oralen Immunisierung der Füchse gegen Tollwut als eine Methode zur Überprüfung des Impferfolges im Rahmen von Impfkampagnen in Fuchspopulationen benutzt.
Seren von Füchsen sollten zur Verwendung im RFFIT nicht älter als drei Tage sein!
Der Fluorescence Antibody Virus Neutralization Test (FAVN) wird vorzugsweise als serologischer Test zur Kontrolle der Wirksamkeit der Tollwutimpfstoffe im Rahmen der Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken (998/2003/EG) angewendet.

RFFIT

Ausführung (Kurzfassung):

- Virusvermehrung aus Masterstockvirus (Laborstamm CVS 11) auf BHK 21 C13 oder BHK 21-BSR/ P5 88-Zellen in Zellkulturflaschen (Dichte 100.000 Zellen/ml),
- Virusernte erfolgt, wenn das Virus etwa zu 100 % abgegeben wurde (IFT-Kontrolle), Überstand abgießen, pH-Wert auf 7,6 bis 7,8 einstellen, Zentrifugation bei 3.000 UpM für ca. 10 min,
- Titration des Arbeitsvirus auf Mikrotiterplatten (Vierfachansatz), Bestimmung des Virustiters nach Kärber, Portionierung z. B. 0,5 ml, Lagerung bei -80 °C (Masterstock).
- Einstellen der Virusgebrauchsverdünnung auf 40 infizierte Zellen nach vorheriger Bestimmung,
- Serum von Nativblutproben (keine EDTA-Plasmaproben); Inaktivierung in Serumverdünnung (1 : 10 in Medium) für 30 min bei 56 °C im Wasserbad oder Heizblock, Zentrifugation bei 3.000 UpM für 10 min,
- Test- und Referenzseren (kalibriertes Positiv- und Negativserum) in log2-Schritten in Mikrotiterplatte oder Röhrchen im Doppelansatz weiterverdünnen (50 µl Endvolumen),

- Zugabe eines äquivalenten Volumens (50 µl) der Virusgebrauchsverdünnung, Inkubation für 90 min bei 37 °C und 5 % CO_2,
- Herstellen der Zellsuspension kurz vor Ablauf der Inkubationszeit (1 x 106 Zellen/ml), Zugabe von 100 µl Zellsuspension/well, kurz schütteln.
- nach vorheriger guter Durchmischung (Plattenschüttler, 5 sec) 10 µl des Virus-Serum-Zell-Gemisches der Mikrotiter- oder Verdünnungsplatte auf die äquivalenten Vertiefungen einer Terasakiplatte übertragen, nach Übertragung einer Verdünnungsreihe erneut schütteln,
- Virus- und Zellkontrolle mitführen,
- Platten für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 in einer feuchten Kammer inkubieren.
- Terasakiplatte einmal vorsichtig mit TW-Puffer spülen, anschließend mit Aceton (80 %) 30 min bei 4 °C fixieren, trocknen,
- Zugabe von 10 µl eines FITC-Antitollwut-Konjugates (Gebrauchsverdünnung lt. Hersteller), 30 bis 60 min in feuchter Kammer inkubieren, anschließend zweimal mit TW-Puffer und einmal mit Aqua dest. spülen,
- fluoreszenzmikroskopische Ablesung des Tests, Bestimmung des nAk-Titers nach Kärber (Grenzwert > 1 : 60) oder Umrechnung in internationale Einheiten (Grenzwert > 0,5 IU/ml)

FAVN

Ausführung (detaillierte Beschreibung im O.I.E. Manual of Standards):

- Virusvermehrung aus Masterstockvirus (Laborstamm CVS 11) auf BHK 21 C13 oder BHK21-BSR/P5 88-Zellen in Zellkulturflaschen (Dichte 100.000 Zellen/ml),
- Virusernte erfolgt, wenn das Virus etwa zu 100 % abgegeben wurde (IFT-Kontrolle), Überstand abgießen, pH-Wert auf 7,6 bis 7,8 einstellen, Zentrifugation bei 3.000 UpM für ca. 10 min,
- Titration des Arbeitsvirus auf Mikrotiterplatten (Vierfachansatz), Bestimmung des Virustiters nach Kärber, Portionierung z. B. 0,5 ml, Lagerung bei -80 °C (Masterstock).
- Einstellen der Virussuspension auf 100 KID50/0,05 ml,
- Serum von Nativblutproben (keine EDTA-Plasmaproben); Inaktivierung unverdünnt oder in Serumverdünnung (1 : 3 in Medium, PBS) für 30 min bei 56 °C im Wasserbad oder Heizblock, Zentrifugation bei 3.000 UpM für 10 min,
- Test- und Referenzseren (WHO-Standardserum, O.I.E. Standardserum vom Hund, kalibriertes Positiv- und Negativserum) in log3-Schritten in Mikrotiterplatte im Vierfachansatz weiterverdünnen (50 µl Endvolumen)
- Zugabe der Virusgebrauchsverdünnung (50 µl), Inkubation für 60 min bei 37 °C und 5 % CO_2,
- Herstellen der Zellsuspension kurz vor Ablauf der Inkubationszeit (4 x 105 Zellen/ml) in Medium, Zugabe von 50 µl Zellsuspension/well, kurz schütteln,
- auf einer Mikrotiterplatte Virus- (Virustitration), Zell-, Positiv- und Negativkontrollen sowie Standardreferenzseren im Vierfachansatz mitführen,
- Platten für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubieren,

- Mikrotiterplatte vorsichtig spülen, anschließend mit Aceton (80 %) oder PFA (3 %) 30 min bei Raumtemperatur fixieren, trocknen,
- Zugabe von 50 µl eines Tollwut-Konjugates (Gebrauchsverdünnung lt. Hersteller), 30 bis 60 min inkubieren, anschließend zweimal mit TW-Puffer und einmal mit Aqua dest. spülen,
- fluoreszenzmikroskopische Ablesung des Tests (alles oder nichts), Bestimmung des nAk-Titers nach Kärber, Umrechnung in internationale Einheiten (Grenzwert > 0,5 IU/ml).

ELISA

Für die postvakzinale Antikörperbestimmung (Hund, Katze) zur Kontrolle der Wirksamkeit der Tollwutimpfstoffe im Rahmen der Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken (998/2003/EG) werden ELISA-Ergebnisse international nicht anerkannt.

Für das Monitoring von oralen Impfkampagnen bei Wildtieren (orale Immunisierung der Füchse gegen Tollwut) können kommerzielle ELISA-Tests verwendet werden, sofern diese für derartige Zwecke validiert und in Deutschland zugelassen sind.

Anhang

Zelllinien:

Virusisolierung:
Na42/13 (Mausneuroblastomzellen)

RFFIT & FAVN:
BHK 21 C13 (Baby Hamster kidney)
BHK 21-BSR/P5 88
Bezugsquelle: FLI Insel Riems, Bio-Bank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Dr. S. Reiche

Medien:

Medien Zelllinie BHK 21 C13 (BHK21-BSR/P5 88)

Entsprechend der Empfehlung der Zellbank

-

Antibiotika:
Amphotericin B (250 µg/ml)
Penicillin (100.000 IE/l), Streptomycin (100 mg/l) oder Gentamycin (50 mg/ml)

-

Medien Zelllinie Na 42/13:

Entsprechend der Empfehlung der Bio-Bank

Antibiotika:
Penicillin (100.000 IE/l), Streptomycin (100 mg/l) oder 50 mg/l Gentamycin

-

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

Puffer, Lösungen, Reagenzien

Dextran-Stammlösung:	0,50 g DEAE-Dextran in 100 ml PBS (Hanks) lösen, sterilfiltrieren, ca. 4 Wochen bei 4 °C haltbar
Dextran-Gebrauchslösung:	0,2 ml Dextr.-SL in 25 ml AZM
Tollwut-Puffer:	1,72 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O + 0,50 g KH_2PO_4 + 7,20 g NaCl ad 1.000 ml Aqua bidest, pH 7,8
PBS (Hanks'):	9,86 g Hanks + 0,35 g $NaHCO_3$ ad 1.000 ml Aqua bidest, pH 7,2
Isotonischer Phosphatpuffer:	8,28 g NaCl + 3,30 g Na_2HPO_4 x 12 H_20 ad 1.000 ml Aqua bidest
(IP)	pH 7,8
IP-Glycerol:	IP - Glycerol = 9 : 1
Anti-Tollwutkonjugate:	siehe Liste der zugelassenen Mittel bzw. der freigegeben Chargen (https://www.fli.de/de/service/zulassungsstelle-des-fli/)
PBS (1x):	8 g NaCl+ 0,2 g KCl+ 1,15 g $Na_2HPO4*2H_2O$+ 0,2 g KH_2PO_4 ad 1.000 ml Aqua bidest
PFA 3 %:	30 g Paraformaldehyd ad 1.000 ml PBS

Literatur

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. (2018), Chapter ~~2~~3.1.17. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses), Paris, (NB: Version adopted in May 2018).
- Fischer, M., Freuling, C. M., Müller, T., Wegelt, A., Kooi, E. A., Rasmussen, T. B., Voller, K., Marston, D. A., Fooks, A. R., Beer, M. & Hoffmann, B. (2014). Molecular double-check strategy for the identification and characterization of European Lyssaviruses. J Virol Methods 203, 23-32.
- Hayman, D. T. S., Banyard, A. C., Wakeley, P. R., Harkess, G., Marston, D., Wood, J. L. N., Cunningham, A. A. & Fooks, A. R. (2011). A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. J Virol Methods 177, 87-93.
- Hoffmann, B., Freuling, C. M., Wakeley, P. R., Rasmussen, T. B., Leech, S., Fooks, A. R., Beer, M. & Müller, T. (2010). Improved Safety for Molecular Diagnosis of Classical Rabies Viruses by Use of a TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR "Double Check" Strategy. J Clin Microbiol 48, 3970-3978.
- Wakeley, P. R., Johnson, N., McElhinney, L. M., Marston, D., Sawyer, J. & Fooks, A. R. (2005). Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. J Clin Microbiol 43, 2786-2792.

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.de