

Amtliche Methodensammlung

Säugerpocken (*Orthopoxinfektion*)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Säugerpocken (Orthopoxinfektion)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Taxonomisch gehört das Genus *Orthopox Virus* in die Subfamilie *Chordopoxvirinae*, die wiederum zugehörig zur Familie *Poxviridae* klassifiziert wird. Der in Europa relevanteste Vertreter des Genus *Orthopox Virus* ist das Kuhpockenvirus (Cowpox Virus CPXV). Reservoirwirt für CPXV sind Nager, insbesondere Wühlmäuse. Als akzidenteller Wirt können sich Haustiere infizieren und vor allem Freigängerkatzen sind besonders gefährdet.

Daneben kam es in der Vergangenheit zu Infektionen bei verschiedenen Zootieren (Elefant, Nashorn, Mangusten, Marmosetten, Großkatzen, Zebra, Okapi, Neuwelt-Kameliden).

Zoonose: Humane Erkrankungsfälle nach Kontakt zu infizierten Tieren sind ein zunehmendes Problem. Dies ist vor allem zurückzuführen auf die steigende Anzahl an Personen, die nie eine Pockenschutzimpfung erhalten haben. In den frühen 80er Jahren wurde die Pockenimpfung in Deutschland eingestellt, so dass heute wieder eine teilweise naive Bevölkerung existiert. Damit ist auch die Protektion vor Kuhpockeninfektionen rückläufig.

Vorkommen: Der Erreger kommt in Deutschland endemisch vor.

1.2 Klinische Symptomatik

Bei Katzen stehen lokale Hautveränderungen im Bereich Gesicht, Pfoten und Nacken im Vordergrund. Bei Tieren, die z. B. durch Glukokortikoid-Therapie eine Immunsuppression zeigen, kann es aber zu generalisierten und letalen Verläufen kommen. Als Haustier gehaltene Ratten wurden in jüngerer Zeit als Überträger auf ihre Halter beschrieben. Dabei waren die Ratten selber auch erkrankt und zeigten neben pockentypischen Hautveränderungen an Nase, Gliedmaßen und Schwanz teilweise auch respiratorische Symptome wie Dyspnoe, Nasen- und Augenausfluss. Gerade Jungratten können schwer erkranken und auch in der Folge von Sekundärinfektionen der Lunge versterben. Bei Alpakas wurden zuletzt mehrfach klinisch erkrankte Tiere beschrieben: pockenartige Hautveränderungen, vor allem an mukokutanen Übergängen, teilweise Stomatitis und Konjunktivitis sowie schwere systemische Verlaufsformen traten dabei auf.

Zootiere zeigen mitunter schwere, generalisierte Krankheitsverläufe mit hohen Morbiditätsraten (insbesondere Marmosetten) und auch lokale Veränderungen der Haut und Hautanhangsgebilde sind ein typisches Erscheinungsbild (Elefant, Nashorn).

1.3 Differentialdiagnose

Die wichtigsten Differentialdiagnosen der Hautveränderungen werden hervorgerufen durch die Erreger Parapocken-Virus (Orf-Virus, Euterpocken, Stomatitis papulosa), Bluetongue-Virus, Maul-und-Klauenseuche-Virus und Bovine-Virus-Diarrhoe-Virus. Bei Katzen und Ratten sind differentialdiagnostisch Hautveränderungen nach, vor allem verletzungsbedingten, Läsionen zu beachten.

1.4 Diagnostische Indikation

Klinisch oder epidemiologisch begründeter Verdacht.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsämter der Länder

Virusanzucht und -typisierung durch das Friedrich-Loeffler-Institut (Nationales Referenzlabor für Affenpocken), Südufer 10, D-17493 Greifswald-Insel Riems

1.6 Rechtsgrundlagen

Säugerpocken bei verschiedenen Tierarten, verursacht durch Erreger des Genus *Orthopox Virus* (exklusive Variola Virus und Affenpocken Virus) sind meldepflichtig (Verordnung über die meldepflichtigen Tierkrankheiten in der jeweils gültigen Fassung).

2. Untersuchungsmaterial

Biopsien und Hautgeschabsel von Hautveränderungen oder Tupferproben des Nasenrachenraums ggf. der Konjunktiven in antibiotikahaltigem Tupfermedium bei 4 °C oder **auch trocken** versandt, sind geeignetes Untersuchungsmaterial. Zur epidemiologischen Untersuchung von Wühlmäusen hat sich die Analyse von **Leber** **Nasenscheidewand**proben bewährt.

3. Untersuchungsgang

3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR

Als real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von viraler DNA des Genus *Orthopox Virus* (OPXV) und der Spezifizierung bzgl. Cowpox Virus (CPXV) ist am FLI ein Protokoll etabliert nach Maksyutov *et al.* (2015) J. Virol. Methods., 211:8-11. "Real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus". Hierbei wird für den OPXV-spezifischen Assay ein Fragment des F4L Gens amplifiziert, während der CPXV-spezifische Assay ein Fragment des konservierten D8L-Gens amplifiziert. Zur Überprüfung der erfolg-reichen DNA-Extraktion und Amplifikation wurde der Triplex-Assay mit einem internen Kontrollsystem, basierend auf dem beta-Aktin-Gen, gekoppelt. Hierbei werden die Sonde und der reverse Primer des beta-Aktin-Assay 2 (nach Toussaint *et al.* (2007) J. Virol. Methods 140 (1-2), 115-123 "Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments.") mit einem neuen forward Primer kombiniert. Dieser neue forward Primer ist nicht mehr nur mRNA-spezifisch, sondern amplifiziert auch sehr erfolgreich die genomische beta-Aktin-DNA aller bisher getesteten Vertebraten. Zur DNA-Extraktion sollte

Säugerpocken (Orthopoxinfektion)

der QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) oder der PCR Template Preparation Kit (Roche) oder vergleichbare Systeme verwendet werden.

Die Amplifizierung erfolgt auf Basis des QuantiTect Multiplex PCR Kit (Qiagen) in 25 µl Gesamtvolumen. Sollte eine andere chemische Basis für die Detektion genutzt werden, muss in Vergleichsexperimenten die Sensitivität und Spezifität der verwendeten Reagenzien gezeigt werden.

Als Kontrollen werden neben DNA-Isolierungskontrolle/n (DIC) eine "No Template" Kontrolle (NTC) und mindestens eine positive Kontrolle (PC) mitgeführt. Als positive Kontrolle sollte eine gering konzentrierte Orthopox-DNA sowie eine CPXV Kontroll-DNA eingesetzt werden (Ct ca. 32), um Kreuzkontaminationen durch die positive Kontrolle zu minimieren.

Zu den vorgelegten 20 µl Mastermix werden 5 µl DNA-Template pipettiert. Folgendes Temperaturprofil sollte zur Anwendung kommen:

<u>Temperaturprofil:</u>				
# Messung der Fluoreszenz in der Annealingphase	Activation Taq	15 min	95 °C	
	Denaturation	60 sec	95 °C	
	Annealing	30 sec	60 °C	45 cycles
	Elongation	30 sec	72 °C	

Datenanalyse:

HEX-Kanal:

Für alle Gewebeproben und die entsprechende DIC sollte die beta-Aktin-IC mit einem vergleichbaren Threshold-Cycle (Ct) nachweisbar sein. Sind die Ct-Werte für die genannten Proben vorhanden, ist von einer erfolgreichen DNA-Isolierung und PCR auszugehen. Ist kein Ct-Wert für die IC feststellbar und gleichzeitig auch keine virusspezifische Amplifizierung aufgetreten, ist die real-time PCR nicht auswertbar und somit ist die DNA-Isolierung und/oder die PCR zu wiederholen.

Für die NTC (SDW) und die PC sollte kein Ct-HEX-Wert feststellbar sein.

FAM-Kanal:

Für die PC sollte ein Ct-Wert feststellbar sein. Hiermit wird die Funktion des OPXV-Genom-Detektionssystems sichergestellt. Ist für die PC kein Ct-Wert feststellbar, ist die PCR mit einem neuen OPXV-Mix und/oder einer neuen PC zu wiederholen.

Für die DIC und die NTC sollte kein Ct-FAM-Wert feststellbar sein.

Wenn alle eingesetzten Kontrollen in richtiger Weise reagieren, ist eine Auswertung der Feldproben-Ansätze möglich.

Eine Orthopocken-Verdachtsprobe wird dann als positiv/verdächtig in der PCR gewertet, wenn ein Ct-FAM-Wert für die entsprechende Probe festgestellt wird oder ein signifikanter Anstieg der FAM-Fluoreszenz über das Basislevel festzustellen ist.

Säugerpocken (Orthopoxinfektion)

TEX-Kanal:

Für die PC sollte ein Ct-Wert feststellbar sein. Hiermit wird die Funktion des CPXV-Genom-Detektionssystems sichergestellt. Ist für die PC kein Ct-Wert feststellbar, ist die PCR mit einem neuen CPXV-Mix und/oder einer neuen PC zu wiederholen.

Für die DIC und die NTC sollte kein Ct-FAM-Wert feststellbar sein.

Wenn alle eingesetzten Kontrollen in richtiger Weise reagieren, ist eine Auswertung der Feldproben-Ansätze möglich.

Eine Cowpox Virus-Verdachtsprobe wird dann als positiv/verdächtig in der PCR gewertet, wenn ein Ct-TEX-Wert für die entsprechende Probe festgestellt wird oder ein signifikanter Anstieg der FAM-Fluoreszenz über das Basislevel festzustellen ist.

OPXV-Mix-FAM

Volumen	Oligo (Konzentration)	Sequenz (5' - 3')
20,0 µl	OPXV-F4L-F (100 pmol/µl)	GATAGTTTTTTTCATTAATCTTTAACAT
20,0 µl	OPXV-F4L-R (100 pmol/µl)	GGCTAGATGTTTCTACGGATTC
5 µl	OPXV-F4L-FAM (100 pmol/µl)	FAM-TTCCGAATGAATGTTTTCAATGGCC-BHQ1
155 µl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 µl	Primer-Probe-mix	

CPXV-Mix-TEX

Volumen	Oligo (Konzentration)	Sequenz (5' - 3')
20,0 µl	CPXV-D8L-F (100 pmol/µl)	GGTAGGTTTCATGTTGGAAAATATC
20,0 µl	CPXV-D8L-R (100 pmol/µl)	AAGATGTTATTAGTGGTATTAGAGAGAAAT
5 µl	CPXV-D8L-RED (100 pmol/µl)	CAL Fluor 610 (ROX analog)- AAGTCATCTACTACATAGACCATGATCAACCAA-BHQ2
155 µl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 µl	Primer-Probe-mix	

Sugerpocken (Orthopoxinfektion)

beta-Actin-DNA-Mix2-HEX:

(Basierend auf einer Publikation von Toussaint *et al.* 2007, modifiziert)

Volumen	Oligo (Konzentration)	Sequenz der Primer/Sonde (5` - 3`)
5,0 µl	ACT2-1030-F (100 pmol/µl)	AGCGCAAGTACTCCGTGTG
5,0 µl	ACT-1135-R (100 pmol/µl)	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT
2,5 µl	ACT-1081-HEX (100 pmol/µl)	HEX- TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT -BHQ1
187,5 µl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 µl	Primer-Sonden-Mix	

Darüber hinaus bestehen PCR-basierte Detektionsverfahren für die differentialdiagnostisch relevanten Vertreter des Genus *Parapox virus* und *Capripox virus*.

3.2 Virusisolierung

Eine Virusanzucht erfolgt im Fall von CPXV auf der Zelllinie Vero (African green monkey) Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine CCLV-RIE228, alternativ kann auch eine Rinderosopharyngeal-Zelllinie CCLV-RIE244 genutzt werden.

3.3 Antikornachweis

Indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis von CPXV reaktiven Antikornern per indirekter Immunfluoreszenz an CPXV infizierte Zellkulturen wurde für die Spezies Katze, Ratte, Rind und Alpaka etabliert.

Hierbei wird die humane Zellkultur HEp-2 CCLV-RIE141 verwendet. Diese Zellkultur wird durch CPXV infiziert, so dass in dem entsprechenden Zellkulturformat (meist 96 Well Format) Einzelplaques entstehen. Nach 24 Stunden wird die Kultur mittels Aceton/Methanol-Behandlung (1/1) fixiert. Nach einem Waschschriff mit PBS- hat sich ein Waschriff mit TBS-T pH 8 für 30 Minuten bewährt. Nach einem weiteren Waschschriff PBS- werden die Kontrollseren sowie die zu testenden Seren (nach Inaktivierung 30 Minuten, 56 °C) in den Verdünnungen 1 : 200 und 1 : 500 auf der vorbereiteten Zellkultur für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriffen PBS- kann der speziesspezifische Zweitantikorn in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung aufgebracht werden (60 Minuten, Raumtemperatur). Zwei weitere Waschschriffe mit PBS- finalisieren das Protokoll, wonach die Auswertung am Immunfluoreszenz-Mikroskop erfolgen kann.

Des Weiteren kann ein Plaquereduktionstest zur Anwendung kommen.

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