

Amtliche Methodensammlung

Rotz

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Rotz

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Burkholderia (B.) mallei ist der Erreger des Rotzes (Malleus, engl. Glanders), einer oft chronisch und seuchenhaft verlaufenden Infektionskrankheit, die primär bei Einhufern auftritt. Esel, Maulesel und Maultiere sind am empfänglichsten, Pferde, Hunde, Katzen, Kamele und auch Menschen gelten als mittelgradig prädisponiert. Rinder und Schweine sind schwer zu infizieren während Ratten sowie Geflügel praktisch resistent sein sollen. Die Krankheit ist eine Kontaktzoonose und gilt als ansteckend für den Menschen.

1.2 Klinische Symptomatik

Rotz tritt in Form knotiger und geschwüriger Entzündungen in der Haut, in der Nasenschleimhaut und in den Lungen auf. Der Erreger wird von Tier zu Tier oder durch Zwischenträger (Futter, Streu, Putzzeug, Geschirr) übertragen. Die Eintrittspforte ist die unverletzte Schleimhaut. Rotz kommt bei Eseln und Maultieren überwiegend in der akuten, bei Pferden überwiegend in der chronischen Form vor. Beim Maultier beginnt der Rotz fast immer mit einer zeitweilig aussetzenden Lahmheit an einem der Hinterbeine. Die Inkubationszeit schwankt von wenigen Tagen bis zu mehreren Monaten. Bei der chronischen Form sind möglicherweise die Erscheinungen nicht erkennbar.

Man unterscheidet:

Nasenrotz mit geschwürigen Veränderungen auf der Nasenschleimhaut und grünlich-gelbem Ausfluss oft nur auf einer Seite, trotz beidseitiger Entzündung.

Hautrotz mit Knoten in der Haut, die geschwürig aufbrechen. Außerdem: Husten und Atembeschwerden (Kehlkopf- und Lungenrotz), zeitweiliges Nasenbluten; der chronische Rotz kann jahrelang bestehen.

1.3 Differentialdiagnostik

Bei Nasenrotz: Druse, Pocken, Tuberkulose, traumatische Geschwüre

Bei Hautrotz: Lymphangitis epizootica, Lymphangitis ulcerosa, Sporotrichose

Bei Lungenrotz: Tuberkulose, Nocardiose, Botryomykose, parasitäre Veränderungen

1.4 Diagnostische Indikation

Handelsuntersuchungen; klinische Symptome, positive serologische Befunde sowie epidemiologisch begründeter Verdacht

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Zuständige Landesuntersuchungsämter
- Nationales Referenzlabor am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Bakterielle Infektionen und Zoonosen, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena

1.6 Rechtsgrundlagen

- Tiergesundheitsgesetz in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung
- Binnenmarkt-Tierseuchenschutz-Verordnung in der jeweils geltenden Fassung
- RICHTLINIE DES RATES 2009/156EG zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Vorschriften für das Verbringen von Equiden und für ihre Einfuhr aus Drittländern
- ENTSCHEIDUNG der Kommission 93/623/EWG über das Dokument zur Identifizierung eingetragener Equiden (Equidenpass)

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Gewinnung

Beim lebenden Tier erfolgt die serologische Untersuchung von Serum.

Der direkte Erregernachweis kann bei akut erkrankten Tieren aus Nasensekret, Lungenauswurf und Hauteiter gelingen, weniger geeignet sind Kot, Genitalausfluss, Harn, Milch, Augensekret, Speichel und Blut.

Von frisch verendeten Tieren sollten pathologisch veränderte Organe, insbesondere eitrige Geschwüre und/oder bindegewebige Knoten in Leber, Lunge und Milz sowie den zugehörigen regionalen Lymphknoten untersucht werden.

2.2 Transport und Lagerung

Untersuchungsmaterial wird als „Biologischer Stoff, Kategorie B“ UN3373 umgehend vorschriftsmäßig in dicht schließenden Behältnissen entsprechend den Gefahrgutvorschriften für Straße und Eisenbahn (ADR), bzw. im Luftverkehr (IATA-DGR) in der jeweils gültigen Fassung mit Vorbericht und Untersuchungsantrag an die Untersuchungseinrichtung geschickt.

Während des Transportes und evtl. notwendig werdender kurzzeitiger Lagerung ist das Material bei Zimmertemperatur aufzubewahren.

Bei kontaminiertem Untersuchungsmaterial soll sich eine dreistündige Aufbewahrung dieses Materials in PBS, dem 1000 IE Penicillin/ml zugesetzt wurde, bei 37 °C günstig auf die Nachweissicherheit auswirken.

Rotz

Die Proben sind mit dem entsprechende Einsendebogen an das FLI zu senden. Dieser kann unter folgendem Link heruntergeladen werden: <http://www.fli.bund.de/de/startseite/institute/institut-fuer-bakterielle-infektionen-und-zoonosen/referenzlabore/oie-und-nrl-fuer-rotz.html>

3. Untersuchungsgang

Vorsichtsmaßnahmen

Burkholderia mallei ist ein Erreger der Risikogruppe 3. Das Arbeiten mit potentiell *B. mallei*-infiziertem Material und mit *B. mallei*-Kulturen in einer Untersuchungseinrichtung ist genehmigungspflichtig und kann nur in Laboratorien der Sicherheitsklasse 3 durchgeführt werden.

3.1 Erregernachweis

Grundsätzlich ist beim Auftreten klinischer Symptome (z.B. Nasensekret, Lungenauswurf, eitrige Hautveränderungen) die Möglichkeit eines direkten Erregernachweises gegeben. Bei chronischem Krankheitsverlauf, der in der Regel ohne klinisch erkennbare Symptome auftritt, gibt es allerdings am lebenden Tier keine sichere Methode, den Erreger direkt nachzuweisen. Eine *post mortem* Untersuchung von inneren Organen wie Lunge, Leber und Milz auf das Vorhandensein von Rotz-typischen Veränderungen ist in diesem Fall unerlässlich, um den Erreger im veränderten Gewebe zu identifizieren.

Der direkte kulturelle Nachweis des Erregers des Rotzes ist schwierig, jedoch als beweisend anzusehen und ist daher in jedem Fall durchzuführen.

3.1.1 Kulturelle Untersuchung

Von den genannten Probenahmestellen werden Objektträger-Ausstrich- oder Abklatschpräparate angefertigt und nach Gram gefärbt. *B. mallei* ist ein kleines Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium von 0,5 x 1,5 (bis 4) µm Größe, mit meist abgerundeten Enden. An den Polen fällt eine intensivere Anfärbung auf.

Für die Anzucht werden folgende Nährmedien empfohlen:

1. Blutagar mit 3-4% Glycerinzusatz

Bei kontaminiertem Probenmaterial geeignet:

2. Brucella-Selektiv-Agar (s. Kapitel Brucellose)
3. Brucella-Selektiv-Bouillon (s. Kapitel Brucellose)

3.1.2 Identifizierung

B. mallei bildet nach 48h bis 72 h tautropfenförmige, glatte, durchscheinende runde Kolonien, die bei weiterer Bebrütung einen leicht grau-gelblichen, schleimig-fadenziehenden Belag bilden. Hämolyse und Pigmentbildung werden nicht beobachtet.

B. mallei in Kultur ist relativ pleomorph, je nach Alter der Kultur variiert seine Größe und Lagerung, in ganz frischen Kulturen ist es kokkoid. Bakterien aus älteren Kulturen sind mitunter keulen- oder knospenförmig und können durch Vakuolen ein körniges Aussehen haben. Sie sind meist einzeln gelagert, in älteren Kulturen sind die Stäbchen länger und täuschen aneinandergelagert mitunter fädige Strukturen vor.

Verdächtige Kolonien können mittels PCR (s. Molekulare Nachweisverfahren) schnell identifiziert werden. Beweglichkeitsprüfung auf halbfesten Nährmedien - *B. mallei* ist unbeweglich, *B. pseudomallei* ist beweglich.

Die biochemische Aktivität von *B. mallei* ist relativ gering. Gelatine wird verflüssigt, Nitrat reduziert, Xylose, Glycin und Arabinose werden hydrolysiert. Bei längerer Kultivierung können sich diese Eigenschaften durch die Bildung von Rauformen eventuell verändern.

Kommerzielle Tests für die biochemische Identifizierung von *B. mallei* sind nicht verfügbar.

3.1.3 Molekulare Nachweisverfahren (Anhang 1)

Der molekulare Nachweis des Erregers aus Gewebeproben und/oder die molekulare Identifizierung von Isolat ist als beweisend anzusehen und ist daher in jedem Fall durchzuführen.

Eine schnelle und zuverlässige Identifizierung von *B. mallei* ist mit einem 5'-Nuclease Real-Time-PCR-Verfahren möglich (Tomaso et al., 2006). Ebenso wurde eine spezifische konventionelle PCR beschrieben (Scholz et al., 2006). Diese Methoden ermöglichen auch die sichere Unterscheidung von *B. mallei* und *B. pseudomallei*, das bei Pferden eine dem Rotz sehr ähnliche Erkrankung (sog. Pseudorotz) hervorrufen kann.

3.2 Serologische Diagnostik

Für Einfuhruntersuchungen ist die KBR durchzuführen. Im internationalen Verkehr mit Drittländern gelten die Einfuhrbestimmungen des jeweiligen Landes. Im „Manual of Standards For Diagnostic Tests and Vaccines“ sind die gültigen Testmethoden für den internationalen Handel beschrieben (OIE, 2011).

Für Abklärungsuntersuchungen von positiven KBR-Befunden ohne vorherige Malleinisierung wurde am Nationalen Referenzlabor für Rotz ein Westernblot-Verfahren etabliert (Elschner et al., 2011).

Das quantitative Verhalten spezifischer *B. mallei*-Antikörper ist im Krankheitsverlauf vielfachen Schwankungen unterworfen und unterliegt keiner deutlichen Gesetzmäßigkeit. Aus diesem Grunde sind mehrere zeitlich versetzte serologische Untersuchungen zur Diagnosefindung durchzuführen.

3.2.1 Komplementbindungsreaktion (Anhang 2)

Die KBR ist eine sehr sensitive Nachweismethode für Rotz. Bei einer Erkrankung treten ab 12. bis 14. Tag p.i. positive Ergebnisse auf. Infektionen mit Pseudomonaden, besonders *B. pseudomallei*, sind serologisch nicht sicher von *B. mallei*-Infektionen zu trennen. Auch Infektionen mit *Actinobacillus lignieresii* sowie *Streptococcus equi* oder anderen können zu serologischen Kreuzreaktionen in der KBR führen. Esel und Maultiere zeigen häufiger antikomplementäre Reaktionen in der KBR.

Rotz

3.2.2 Weitere serologische Untersuchungsverfahren

Für die serologische Bestätigungsdiagnostik wurde am Nationalen Referenzlabor ein Westernblot etabliert (Elschner et al., 2011). Mehrere ELISA-Tests wurden für die Rotz-Diagnostik bereits entwickelt, sind wegen mangelnder Spezifität jedoch für die Routineanwendung nicht zu empfehlen.

3.3 Allergische Diagnostik - Malleintest

Der Mallein-Test kann als Option zu serologischen Tests bei antikomplementären Eigenschaften des Probenmaterials dienen, ist als Test für Handelsuntersuchungen im Rahmen der EU-Einfuhrbestimmungen jedoch nicht zugelassen.

Der Mallein-Test ist im Vergleich zur KBR weniger sensitiv (Naureen et al., 2007). Eine Vorbehandlung des Tieres kann die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Ein negativer Mallein-Test bei einem KBR-positiv getesteten Tier schließt eine Infektion mit *B. mallei* nicht sicher aus.

Es ist möglich, dass infolge des Mallein-Tests das Tier lange serologisch positiv reagiert. Serologische Nachuntersuchungen werden dadurch beeinträchtigt.

Es wird die Verwendung eines allergiefreien Malleins oder Mallein-PPD (purified protein derivative) empfohlen, um eine Sensibilisierung zu vermeiden. Derzeit ist kein zugelassenes Mallein für den Einsatz in Deutschland verfügbar.

Bewertung der Ergebnisse

Positive serologische Befunde in der KBR bedürfen immer einer sofortigen Abklärungsuntersuchung und ziehen 3 Nachuntersuchungen des Tieres im Abstand von 2 bis 3 Wochen nach sich.

Serologische Abklärungsuntersuchungen in Verdachts- oder Ausbruchsbeständen sind mindestens 3-mal im Abstand von 2 bis 3 Wochen negativ verlaufen, bevor eine Bestandssperre aufgehoben wird.

Positive serologische Befunde in der KBR, die mittels Westernblot bestätigt wurden, sind als beweisend für eine Rotzinfektion anzusehen.

Der direkte kulturelle Nachweis und die molekulare Identifizierung des Erregers sind als beweisend für eine Rotzinfektion anzusehen.

Da die kulturelle Isolierung von *B. mallei* aus Geweben eher selten gelingt, ist auch allein der molekulare Nachweis von *B. mallei* in Geweben als beweisend für eine Rotzinfektion anzusehen.

Anhang 1

Molekularer Nachweis von spezifischen Gensequenzen des Flagellin-Apparates von *Burkholderia mallei* nach Scholz et al. (2006)Mastermix-Komponenten:Primer *fliP*-f, *fliP*-r: 10µM (siehe Tabelle 1)

dNTP-Mix: 10mM (z.B. Eppendorf)

Taq-DNA-Polymerase: 5U/µl (z.B. Eppendorf)

Taq-PCR-Puffer 10x

DMSO: unverdünnt (p.a.)

Wasser: HPLC grade

Tabelle 1:

Primer	Nukleotidsequenz 5' → 3'
<i>fliP</i> -f	tcaggtttgtatgtcgctcgg
<i>fliP</i> -r	ctaggtgaagctctgcgcgag

PCR Mastermix (MM)	je Probe (µl)	Thermocycler-Programm (Mastercycler Eppendorf)
Wasser	12,84	94°C 30s, 40 x (94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 60 s), 72°C 7min Ergebnis: 989 bp
PCR-Puffer (10x)	2,00	
dNTP (10mM)	0,80	
Primer <i>fliP</i> -f (10 µM)	0,60	
Primer <i>fliP</i> -r (10 µM)	0,60	
DMSO	1,00	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/µl)	0,16	
Template DNA	2,00	

Realtime Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von *Burkholderia mallei*-Isolaten nach Tomaso et al. (2006)

Mastermix-Komponenten:

Fertig-Reaktionsmix (z.B. TaqMan Universal MM Applied Biosystems #4304437)

Primer- Stammlösung 100 pmol/µl, Arbeitsverdünnung 1:10 (entspr. 10 pmol/µl) (Sequenzen s. Tabelle 2)

Sonde: Vorratslösung 10 pmol/µl bzw. 10 µM herstellen (Sequenzen s. Tabelle 1)

DNase-RNase freies Wasser, PCR-Gefäße oder PCR-Platten für Realtime-PCR

Tabelle 2:

Primer/ Sonde	Nukleotidsequenz 5'-3'
Bma <i>flIP</i> -f	cccattgaccctatcgaag
Bma <i>flIP</i> -r	gcccgacgaqcacctgatt
Bma-probe	6FAM-caggtcaacgaacttcacgcgqatc-BHQ1

PCR Mastermix (MM)	je Probe (µl)	Thermocycler-Programm (MX3000)
Wasser	9,75	50°C 2min; 95°C 10 min, 45 x (95°C 25s, 63°C 60s)
PCR-Puffer (2x)	12,50	
Primer <i>flIP</i> -f (10 µM)	0,25	
Primer <i>flIP</i> -r (10 µM)	0,25	
Bma-probe (10 µM)	0,25	
Template DNA	2,00	

Anhang 2

Komplementbindungsreaktion (KBR)

Empfehlung zur Durchführung der KBR in der Mikro-Methode

1. Materialien und Reagenzien

KBR-Malleus- Antigen, zugel. nach § 17c TierSG (z. B. Fa. C.c.pro GmbH, Oberdorla, Zul.-Nr.BFAV-B349)

Kontrollserum, positiv, zugel. nach § 17c TierSG (z. B. Fa. C.c.pro GmbH, Oberdorla, Zul.-Nr.BFAV-B349)

Die Verdünnung des o.g. zugelassenen KBR Antigens bezieht sich auf die Verwendung der KBR-Reagenzien der Firma Institut Virion/ Serion GmbH, Würzburg.

Kontrollserum, negativ

Komplement (Institut Virion/ Serion GmbH, Würzburg).

Amozeptor (Institut Virion/ Serion GmbH, Würzburg).

KBR-Puffer (Institut Virion/ Serion GmbH, Würzburg).

Hammelblut (stabilisierte 1%ige Suspension, z.B. Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH, Ochsenhausen).

Mikrotiterplatten

Bei der Verwendung kommerzieller KBR Reagenzien ist die Gebrauchsanweisung des Herstellers zu beachten.

2. Durchführung

2.1 Probenvorbereitung

Serumproben und Antigen auf Raumtemperatur erwärmen.

Vor der Untersuchung sind alle zu untersuchenden Proben einschließlich Kontrollseren im Wasserbad in entsprechender Verdünnung wie folgt zu inaktivieren:

Serumverdünnung	Tierart	Temp. (°C)	Zeit (min)
1:5	Pferd	58	30
1:5	Maultier, Maulesel, Esel	63	50

Verunreinigte und hämolytische Seren sind zur Untersuchung nicht geeignet.

Rotz

2.2 KBR-Ansatz

In der Tabelle 3 werden die Arbeitsschritte für eine Probe und ein Antigen als Modell dargestellt.

Tabelle 3a: KBR-Schritte - Proben Tag 1

Arbeitsschritte		Well									
		1 (SK)	2 1:5	3 1:10	4 1:20	:	:	:	10 1:	:	:
1. KBR-Puffer	(µl)	25	-	25	:	:	:	:	:	:	:
2. Serum	(µl)	25	25	25	:	:	:	:	:	:	:
3. Titration des Serums von 3 nach 10 (verwerfen von 25 µl aus dem Wells 10)											
4. Antigen	(µl)	25	25	25	:	:	:	:	:	:	:
5. Komplement	(µl)	25	25	25	:	:	:	:	:	:	:

Bei der Durchführung des KBR-Ansatzes sind jeweils folgende Kontrollansätze mitzuführen:

a. Kontrolle der antikomplementären Wirkung des Serums (Serumkontrolle SK), angesetzt in Well 1: Bewertung: 100 % Hämolyse

b. Kontrollen des Antigens

KBR-PUFFER:	25 µl
Antigen:	25 µl
Komplement:	25 µl
HS Tag 2:	50 µl

Bewertung : 100 % Hämolyse

c. Kontrollen des Komplements (nach Herstellerangaben ggf. titrieren)

KBR-PUFFER:	50 µl
Komplement:	25 µl
HS Tag 2:	50 µl

Bewertung : 100 % Hämolyse

d. Kontrolle des Hämolytischen Systems (HS)

KBR-PUFFER:	75 µl
HS Tag 2:	50 µl

Bewertung : 0 % Hämolyse

Abgedeckte Platte 18 bis 24h bei +5 °C ± 3 °C inkubieren.

Tag 2: Platten auf Raumtemperatur erwärmen

Herstellung des Hämolytisches System (HS)

Verdünnung des Ambozeptors nach Herstellerangaben in KBR-Puffer und Mischen mit der Erythrozytensuspension im Verhältnis 1+1. Inkubation des HS für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad.

Vortemperierung der KBR-Platten bei 37°C.

Tabelle 3b: KBR-Schritte Proben Tag 2

6. HS	(µl)	50	50	50	:	:	:	:		
Inkubation 15- 30' bei +37 °C ± 1 °C im Brutschrank in einer feuchten Kammer. Hämolysekontrolle! Inkubation abbrechen, wenn die Komplementkontrollen mit 2 und 1 Einheiten eine komplette Hämolyse zeigen. Zentrifugation 5 min bei 2000 Upm										

Auswertung

Bei der Ablesung wird unterschieden:

100 % Hämolysehemmung = 4 (++++)

75 % Hämolysehemmung = 3 (+++)

50 % Hämolysehemmung = 2 (++)

25 % Hämolysehemmung = 1 (+)

keine Hämolysehemmung = negativ

Titerbeurteilung: Gemäß O.I.E. Handbuch (2011) werden die Titer wie folgt beurteilt:

Eine Serumprobe in der Verdünnung von 1:5

mit 100 % Hämolyse ist negativ,

mit 25 - 75 % Hämolyse ist verdächtig

ohne Hämolyse ist positiv.

Literatur

- ELSCHNER MC, SCHOLZ HC, MARTEN P, RASSBACH A, DIETZSCH M, MELZER F, SCHMOOCK G, DE ASSIS SANTANA VL, DE SOUZA MM, WERNERY R, WERNERY U, NEUBAUER H (2011): Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet Res* 7,4.
- NAUREEN, A.; SAQIB, M.; MUHAMMAD, G.; HUSSAIN, M. H., AND ASI, M. N. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J Vet Diagn Invest.* 2007 Jul; 19(4):362-7.
- OIE. 2011. Manual of Standards For Diagnostic Tests and Vaccines, OIE, online-Version.
- SCHOLZ, H. C., M. JOSEPH, H. TOMASO, S. AL DAHOUK, A. WITTE, J. KINNE, R.M. HAGEN, R. WERNERY, U. WERNERY UND H. NEUBAUER. 2006. Detection of the re-emerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed flip-based PCR assay. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.*, 54, 241-247.
- TOMASO, H., H.C. SCHOLZ, S. AL DAHOUK, M. EICKHOFF, T.M. TREU, R. WERNERY, U. WERNERY UND H. NEUBAUER. 2006. Real-time identification of *Burkholderia pseudomallei* with a 5' nuclease real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Clin. Chem.*, 52, 307-310.