

Amtliche Methodensammlung

Enzootische Leukose der Rinder (*bovines Leukosevirus*)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Enzootische Leukose der Rinder

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die enzootische Rinderleukose (ERL) ist eine bei allen Rinderrassen und vereinzelt beim Schaf auftretende virusbedingte Tumorerkrankung des retikuloendothelialen Systems. Das infektiöse Agens ist das bovine Leukosevirus (BLV), ein exogenes B-Zell-lymphotropes Retrovirus.

1.2 Klinische Symptomatik

Nach einer unterschiedlich langen Inkubationszeit sind

- ein klinisch inapparentes,
- ein präleukotisches und
- ein tumoröses Stadium

zu unterscheiden.

Die Ausbildung von Tumoren stellt das eigentliche Krankheitsbild dar, welches aber nur bei wenigen infizierten Tieren als Endstadium der Erkrankung auftritt und je nach Lokalisation der Veränderung und in unterschiedlichen Zeiträumen zum Tode führen kann. Plötzliche Todesfälle können durch Milzrupturen verursacht werden.

Die Diagnostik erfolgt

- pathologisch-anatomisch durch den Nachweis des Tumorstadiums (Leukoseverdacht),
- durch histologische Tumordifferenzierung (pathognomonisch),
- serologisch durch den Nachweis von Antikörpern im Blut und/oder Milch,
- durch den elektronenoptischen Nachweis des Erregers,
- durch den Provirusnachweis mit Hilfe der PCR.

Eine persistierende Lymphozytose mit sehr hohen Lymphozytenwerten wird als pathognomonisch angesehen.

1.3 Differentialdiagnose

Je nach Verlauf des Tumorstadiums kann es zu Leistungsdepressionen, Inappetenz, Lahmheit, Exophthalmus und Blutbildveränderungen kommen, die von entsprechenden Veränderungen vielfältiger anderer Genese (Formen der sporadischen Rinderleukose, wie sporadisch auftretende Jungtierleukose, Hautleukose und Thymusleukose) unterschieden werden müssen.

1.4 Diagnostische Indikation

Test zur Bescheinigung der Leukosefreiheit im Sinne des Artikel 6, Absatz 2c oder zur Feststellung und Erhaltung des Bestandsstatus gemäß Anhang D, Kapitel I der EG-Richtlinie 64/432, zuletzt geändert durch die Richtlinie 2013/20/EU vom 13.05.2013.

Zusätzlich: Abklärung von Tumorerkrankungen beim Einzeltier, als Handels- oder Quarantäneuntersuchung (Import/Export, Sanierungsbetriebe u. ä.).

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Auf der Grundlage der aktuellen Fassung der Rinderleukose-Verordnung und der Anlage D der EG-Richtlinie 64/432, zuletzt geändert durch Richtlinie 2013/20/EU vom 13.05.2013, Kapitel II erfolgt die Antikörperdiagnostik im

- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) und/oder mit dem
- Agargel-ImmunDiffusionstest (AGID, IDT)

durch staatliche Untersuchungseinrichtungen und in Tiergesundheitsämtern.

Die Bestätigung positiver Leukosebefunde und Abklärungsuntersuchungen bei zweifelhaften Antikörperbefunden werden durch das NRL für ERL am FLI, Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems u. a. mittels PCR zum BLV-Provirusnachweis durchgeführt.

Die amtliche Feststellung der Seuche obliegt der zuständigen Veterinärbehörde. Impfungen und Heilversuche sind verboten.

1.6 Rechtsgrundlagen

Die ERL ist in Deutschland als Tierseuche anzeigepflichtig und eine bei der OIE gelistete Erkrankung.

Bestehende Rechtsvorschriften:

international:

- EG-Richtlinie 64/432, zuletzt geändert durch die Richtlinie 2013/20/EU vom 13.05.2013
- Anlage D der EG-Richtlinie 2013/20/EU vom 13.05.2013

national:

- Verordnung zum Schutz gegen die Leukose der Rinder (Rinderleukose-Verordnung) in der Fassung der Bekanntmachung vom 13. März 1997 (BGBl. I S. 458), zuletzt geändert durch Artikel 4 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388)
- Empfehlungen enthält das OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7. Auflage (2012), Kapitel 2.4.11

Enzootische Leukose der Rinder

2. Untersuchungsmaterial

EDTA-Vollblut, Blutserum, Blutplasma

Zur Einzeltierdiagnostik wird 3 bis 5 ml venöses **Vollblut** benötigt, das unter sterilen Kautelen gewonnen wurde. Das Blutserum bzw. Blutplasma wird auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen BLV untersucht.

Zur Untersuchung der Lymphozyten auf BLV-spezifische provirale DNA wird EDTA-Blut benötigt. Weil Heparin und Citrat einen inhibierenden Einfluss auf die PCR-Reaktion haben können, ist Blut aus Heparin- oder Citrat-Röhrchen für diese Untersuchung ungeeignet. Der Transport der Blutproben zur Untersuchungseinrichtung erfolgt vorzugsweise per Kurierdienst. Stark hämolytische oder offensichtlich veränderte Seren sind zur Untersuchung ungeeignet. Bei der Diagnostik ist zu beachten, dass im geburtsnahen Zeitraum der Antikörperspiegel im Blutserum unter die verfahrensbedingte Nachweisgrenze des Agargel-Immuno-Diffusionstests (AGID) sinken kann. Wenn es die analytische Sensitivität des ELISA ermöglicht, können Seren auch als Pool geprüft werden. Im Kühlschrank können Serumproben ca. eine Woche, bei mindestens -20 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Einzelgemelk, Poolmilch, Sammelmilch (Kannen- oder Tankmilch)

Zur Untersuchung ist die weitgehend fettfreie, flüssige Sekretfraktion zu verwenden. Einzelgemelke können gepoolt werden. Aus Milchkannen oder Milchtanks können Sammelmilchproben entnommen werden. Laut der EG-Richtlinie 64/432, zuletzt geändert durch die Richtlinie 2013/20/EU vom 13.05.2013, Anlage D; Abschnitt C; Punkt 2 richtet sich die Anzahl der Einzelgemelke, die zur Diagnostik in der Poolmilch oder der Sammelmilch enthalten sein dürfen, nach der analytischen Sensitivität des verwendeten Diagnostikkits (siehe Kapitel indirekter Erregernachweis).

Laut Punkt 3c der oben genannten Richtlinie muss bei der Untersuchung von Sammelmilchproben darauf geachtet werden, dass diese aus Milch gebildet werden, die in einem Betrieb mit mindestens 30 % laktierender Milchkühe gesammelt wurden. Etwaige Bestätigungstests sind mit Einzelgemelken durchzuführen.

Die Milchproben können mit oder ohne Konservierungsmittel versetzt untersucht werden.

Zum Aufrahmen sind die Milchproben vor der Untersuchung kühl zu lagern. Nicht genügend aufgerahmte Milch ist über 20 min bei 2000 g zu zentrifugieren. Anschließend wird die Rahmschicht durch Absaugen oder Dekantieren entfernt oder zur Entnahme der flüssigen Sekretfraktion mit der Pipettenspitze durchstoßen.

Untersuchungsmenge: 1 bis 2 ml Milch

Verunreinigte oder zersetzte Proben sind zur Untersuchung ungeeignet. Unkonserviert sind die Proben bei Kühlschranktemperatur bis zu fünf Tagen zur Untersuchung verwendbar. Eine längere Lagerfähigkeit ist bei mindestens -20 °C gegeben.

Präkolostrum, Erstkolostrum

Im Stadium der Hochträchtigkeit erfolgt ein zunehmender Transfer von Antikörpern in das Eutersekret. Vier Wochen ante partum (Präkolostrum) bis zum ersten Gemelk post partum (Erstkolostrum) ist der BLV-Antikörperspiegel im Eutersekret bis zu fünfmal höher als im Blutserum. Diese Besonderheit ist bei der diagnostischen Untersuchung mit dem AGID zu beachten. Im Einzelfall kann mittels Kolostrumuntersuchung im AGID ein fragliches Blutergebnis bestätigt werden.

3. Untersuchungsgang

Dem indirekten Nachweis der Infektion durch die Bestimmung spezifischer Antikörper kommt eine zentrale Bedeutung zu. Die direkten Nachweisverfahren werden bei besonderen Fragestellungen am Nationalen Referenzlabor für EBL am Friedrich-Loeffler-Institut bei serologisch zweifelhaften Befunden eingesetzt.

3.1 Indirekter Erregernachweis (Antikörpernachweis)

Antikörper können im Blutserum oder Blutplasma und/oder in der Milch bei infizierten Rindern mit Hilfe kommerziell erhältlicher und zugelassener Testsysteme nachgewiesen werden.

Die amtlich zugelassenen, kommerziell erhältlichen Tests und freigegebenen Chargen sind in der Liste der nach § 17 c TierSG zugelassenen Mittel bei der Zulassungsstelle des FLI einzusehen (ab 2015 im TierGesG § 11, Abs. 2, Satz 1).

Siehe auch:

http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf.

Ein auf die Leukosediagnostik ausgerichteter Auszug dieser Liste ist als Anlage beigefügt.

Enzootische Leukose der Rinder

Gemäß der Anlage D der EG-Richtlinie 64/432/EWG, zuletzt geändert durch die Richtlinie 2013/20/EU vom 13.05.2013, Kapitel II; Abschnitt A und C werden folgende Testsysteme zum Antikörpernachweis gegen BLV eingesetzt:

Diagnostischer Standard:

- amtliches OIE-Referenzserum E05, zu beziehen von der:
Universität Leipzig, Institut für Virologie
OIE-Referenzlabor für Enzootische Bovine Leukose (EBL),
An den Tierkliniken 29, D-04103 Leipzig,
Tel.: 0341-9738201, Fax: 0341-9738219
Mail: thomas.vahlenkamp@uni-leipzig.de
- nationale Referenzseren und Milch, zu beziehen vom:
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für Infektionsmedizin
NRL für Enzootische Rinderleukose (ERL)
Südufer 10
17493 Greifswald - Insel Riems
Tel.: 038351-71270; Fax: 038351-71226
Mail: guenter.kotterba@fli.bund.de

3.1.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

zum Nachweis von Antikörpern gegen BLV in Blutserum, Blutplasma und Milch, in Einzel- und Sammelproben gemäß Richtlinie 64/432/EWG vom 14.06.1988, zuletzt geändert durch die Richtlinie 2013/20/EWG des Rates vom 13.05.2013, Anlage D, Kapitel II, Abschnitt C, Punkt 2 und Punkt 3.

Der ELISA-Test muss so empfindlich sein, dass das OIE-Referenzserum (E05) positiv reagiert, wenn es 10-mal (Serumprobe) bzw. 250-mal (Milchprobe) so stark verdünnt wird wie die Lösung, die sich aus der Zusammenfassung von Einzelproben in Pools ergibt (siehe Tabelle 1 und 2). Diese Verdünnungsverhältnisse gelten auch bei der Untersuchung von Einzelproben.

Tab. 1: Zusammenhang zwischen der analytischen Sensitivität eines Testes und der Anzahl der Seren, die als Sammelprobe untersucht werden dürfen

analytische Sensitivität von E05 in Serum/PBS	max. mögliche Anzahl von Serumproben, die als Sammelprobe geprüft werden dürfen
1:10	1
1:100	10
1:200	20

Tab. 2: Zusammenhang zwischen der analytischen Sensitivität eines Testes und der Anzahl der Einzelgemelke, die als Sammelgemelk untersucht werden dürfen

analytische Sensitivität von E 05 in Milch	max. mögliche Anzahl von Einzelgemelken, die als Sammelprobe geprüft werden dürfen
1:250	1
1:6.250	25
1:12.500	50
1:25.000	100
1:62.500	250

Enzootische Leukose der Rinder

Das NRL für Leukose ist für die Qualitätskontrolle der ELISA-Testkits verantwortlich und legt auf der Grundlage des für das E05-Serum erhaltenen Titer fest, wie viele Einzelproben für den ELISA in Pools zusammengefasst werden können. Die Herstellung von Pools aus Einzelproben sollte dem Untersuchungslabor vorbehalten bleiben. Bei Herstellung von Sammelproben ist darauf zu achten, dass die zur Untersuchung genommenen Proben zweifelsfrei einzelnen Tieren zugeordnet werden können. Dadurch ist gesichert, dass u. U. notwendige Bestätigungstest an Blut- oder Milchproben einzelner Tiere durchgeführt werden können.

Die Sensitivität des ELISA ist ca. 100-mal höher als die des AGID.

Der Untersuchungsgang kann innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen sein.

Die Durchführung der Tests erfolgt nach den Gebrauchsinformationen der Hersteller.

3.1.2 Agargel-Immundiffusionstest (AGID)

zum Nachweis von Antikörpern im Blutserum bei Einzeltieren und im Einzelfall auch im Kolostrum. Die Dauer der Untersuchung beträgt 4 Tage.

3.2 Direkter Virusnachweis

Nachweis des BLV-Provirus durch PCR

Bei infizierten Rindern ist das BLV in seiner proviralen Form in die DNA der Wirtszelle integriert und kann mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Die Methodik wird kontinuierlich weiterentwickelt. Eine Etablierung als diagnostische Methode zum Nachweis der BLV-Infektion wird international empfohlen (siehe "OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals", 2012).

Die Dauer der Untersuchung beträgt ca. 24 bis 36 Stunden.

Andere Verfahren zum direkten Erregernachweis

Der direkte Erregernachweis (BLV) kann erfolgen durch:

- Elektronenmikroskopie
- Virusisolierung mit Nachweis Synzytien-bildender Eigenschaften des BLV

Von praktischer Bedeutung ist die in vitro-Kultivierung von Lymphozyten mit anschließender Erregerisolierung und -charakterisierung.

Tierseuchenrechtlich hat der direkte Virusnachweis noch keine Relevanz. Diese Methoden werden ausschließlich im Rahmen der experimentellen Leukoserecherche angewendet (Nationales Referenzlabor für ERL am FLI).

4. Probeneinsendung an FLI:

Für die Einsendung von Proben an das NRL für ERL ist der Einsendungsfragebogen zu verwenden, der auf der Webseite des FLI:

http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/IMED/Einsendeformulare/EinsendebogenNRL_EBL_CAE_MV-12-09-14.pdf abrufbar ist.

Die zuständigen Ansprechpartner und deren Kontaktdaten sind darauf vermerkt.

Enzootische Leukose der Rinder

Anlage:

Auszug aus der Liste der nach § 17 c TierSG zugelassenen Mittel/List of certified products pursuant to section 17 c Animal Diseases Act

(Quelle: http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf)

Stand/Updated: 2014-09-08

Erreger	Bezeichnung des Mittels	Kurzform	Firma	Zul.-Nr.
BLV	Test zum Nachweis von Antikörpern gegen das Bovine Leukose-Virus (Milch)	Handelsformen: IDEXX Leukosis Milk Screening IDEXX Leukosis Milk Verification	IDEXX Europe B.V.	BGAF-B 104
	Test zum Nachweis von Antikörpern gegen das Gp51-Protein des Virus der enzootischen Rinderleukose	IDEXX Leucosis Blocking	IDEXX Europe B.V.	FLI-B 408
	Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Bovine Leukosevirus (BVL)	IDEXX-Leukosis Serum X2	IDEXX Europe B.V.	FLI-B 417
	Serologischer Nachweis der Enzootischen Rinderleukose mittels Agar-Gel Immunodiffusionstest	Pourquier AGID Leukosis	IDEXX Europe B.V.	FLI-B 466
	ID Screen BLV Competition	BLVC	ID VET	FLI-B 594
	BOVINE LEUCOSE AGID		Synbiotics	FLI-B 542
	SERELISA BLV Antikörper Mono Blocking		Synbiotics	BGVV-B 223
	SERELISA BLV Antikörper Bi Indirekt		Synbiotics	BGVV-B 224

Enzootische Leukose der Rinder

Erreger	Bezeichnung des Mittels	Kurzform	Firma	Zul.-Nr.
	SERELISA BLV Antikörper Mono Indirekt		Synbiotics	BGVV-B 225
	LACTELISA BLV Antikörper Mono Indirekt		Synbiotics	BGVV-B 226
	LACTELISA BLV Antikörper Bi Indirekt		Synbiotics	BGVV-B 227
	LACTELISA BLV Ab Bi Indirect Tank 250		Synbiotics	BGVV-B 280
	IDvet BLV AGID	in den Handelsformen: 1. BLV-AGID (mit Agargel) 2. BLV-AGID-NOGEL (ohne Agargel)	IDvet	FLI-B 640

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