

Amtliche Methodensammlung

Afrikanische Schweinepest

- 1. Charakterisierung der Infektion**
- 2. Untersuchungsmaterial**
- 3. Untersuchungsgang**

Afrikanische Schweinepest

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Erreger der Afrikanischen Schweinepest (ASP) ist ein großes, komplexes DNA Virus aus dem Genus *Asfivirus* der Familie *Asfarviridae* (ASFAR = African Swine Fever And Related Viruses). Das ASP-Virus (ASPV) kann von Lederzecken des Genus *Ornithodoros* übertragen werden und ist damit das bisher einzige DNA Virus, das als Arbovirus (arthropod borne virus) klassifiziert werden kann. Der Vektorübertragung kommt in Deutschland und Zentraleuropa nach bisherigem Kenntnisstand keine Bedeutung zu.

1.2 Klinische Symptomatik

Die ASP ist eine Infektionskrankheit der Haus- und Wildschweine, die mit einem sehr variablen klinischen Bild und unterschiedlicher Kontagiosität einhergehen kann. Abhängig von der Virulenz des Virus und diversen Wirtsfaktoren werden perakute bis chronische Verläufe beobachtet. Die Kontagiosität ist insbesondere dann hoch, wenn es zu Blutkontakt kommt. Ohne Blutkontakt kann es selbst in Kleingruppen zu schleppenden oder abreißen Infektionsketten kommen. Klinisch ist die ASP nicht von der klassischen Schweinepest (KSP) zu unterscheiden. Aus diesem Grunde ist eine labordiagnostische Abklärung zwingend erforderlich. Es stehen sowohl direkte Verfahren zum Nachweis des Erregers als auch indirekte Verfahren zum Antikörpernachweis zur Verfügung.

Seit die Afrikanische Schweinepest (ASP) im Jahr 2007 nach Georgien eingeschleppt wurde, hat sie einen Siegeszug über mehrere Kontinente angetreten. Im Bereich der EU sind derzeit alle baltischen Staaten, Polen, Rumänien, Bulgarien, Ungarn und seit Kurzem auch Belgien betroffen. Mit dem Eintrag nach China im August 2018 erreichte die Seuche darüber hinaus den weltweit größten Schweineproduzenten.

Anfang des Jahres 2014 meldeten sowohl Litauen als auch Polen den Nachweis von ASPV in Wildschweinen in der Grenzregion zu Weißrussland, wo im Juni 2013 ein Ausbruch der ASP in Hausschweinen aufgetreten war. Ende Juni 2014 meldete auch Lettland ASP-Fälle im Schwarzwild und Ausbrüche in nicht-kommerziellen Schweinehaltungen. Seither werden von dort regelmäßig neue Fälle im Schwarzwild gemeldet, sporadische Ausbrüche gibt es auch bei Hausschweinen. Derzeit sind in der EU die baltischen Mitgliedstaaten, Polen, die Tschechische Republik, Ungarn und Rumänien betroffen. Die genannten Fälle stehen in Verbindung mit dem seit 2007 andauernden Seuchengeschehen in der Russischen Föderation und den benachbarten Staaten.

Auch in Afrika ist eine deutliche Ausbreitungstendenz zu beobachten. Darüber hinaus gibt es seit 1978 ein unabhängiges endemisches Geschehen auf Sardinien. Die Verfütterung von Speiseabfällen und unzureichend desinfizierte Schweinetransporter, die aus betroffenen Gebieten zurückkehren, sind Risikofaktoren für die Einschleppung. Generell sind jedoch auch lebende Schweine (inklusive Wildschweine), Sperma sowie tierische Erzeugnisse und Rohstoffe als Einschleppungswege denkbar. Direkte und indirekte Kontakte können in

die Übertragung eingebunden sein. Auch Jagdreisen in betroffene Gebiete können ein Risiko darstellen, wenn unzureichend gereinigte Utensilien oder unbehandelte Trophäen mitgebracht werden.

Nach einer Inkubationszeit von zwei bis sieben Tagen (die im EU-Recht angenommene maximale Inkubationszeit beträgt 45 Tage) entwickeln die betroffenen Tiere hohes Fieber und schwere, unspezifische Allgemeinsymptome (Futterverweigerung, Mattigkeit, Bindehautentzündungen, Bewegungsstörungen, Diarrhoe, stark erhöhte Atemfrequenz). Trächtige Sauen können verferkeln. Bei akuten Verläufen kann es zur Ausprägung hämorrhagischer (Petechien in Haut- und Schleimhaut, Nasenbluten, blutige Diarrhoe) und neurologischer Symptome kommen. Die aktuell in Europa kursierenden Viren sind mit wenigen Ausnahmen hoch virulent und verursachen ein schweres, nahezu altersunabhängiges, unspezifisches Krankheitsbild, das nach sieben bis zehn Tagen mit dem Tod des Tieres endet (Letalität nahezu 100 %).

Die Virusausscheidung beginnt bei den betroffenen Schweinen in der Regel am 2. bis 4. Tag nach der Infektion und dauert über längere Zeit (unter experimentellen Bedingungen am FLI stammabhängig bis zu 90 Tage, in der Literatur sind 12 Monate genannt) bzw. bis zum Tod des Tieres an. Nach akut-letalen Verläufen sind selten Antikörper nachweisbar; bei subakuten, chronischen oder transienten Verläufen sind ca. sieben bis zehn Tage nach der Infektion Antikörper nachweisbar.

Gegen die ASP gibt es bislang keinen Impfstoff oder therapeutische Maßnahmen.

1.3 Differentialdiagnose

Die Afrikanische Schweinepest geht mit schweren, aber unspezifischen Allgemeinsymptomen einher, die sich klinisch nicht von anderen systemischen Erkrankungen unterscheiden lassen, die bei Schweinen häufig vorkommen. Aus diesem Grund ist eine labordiagnostische Abklärung (Ausschlussdiagnostik) zwingend notwendig, wenn die Erkrankung nicht zweifelsfrei einer anderen Genese zugeordnet werden kann. Diese Untersuchungen können in den Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durchgeführt werden.

Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen gehören, neben der KSP, bakterielle Septikämien, Circovirusinfektionen, schwere Verlaufsformen des porzinen reproduktiven und respiratorischen Syndroms (PRRS) und die Aujeszky'sche Krankheit. Aufgrund des variablen klinischen Bildes kommen jedoch auch viele andere Erkrankungen viraler, bakterieller und nicht-infektiöser Genese in Frage.

1.4 Diagnostische Indikation

Gemäß Schweinepest-Verordnung.

Afrikanische Schweinepest

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Zuständige Untersuchungseinrichtungen sind das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems sowie die von den jeweils zuständigen Landesbehörden dazu bestimmten Untersuchungseinrichtungen der Länder.

Vor dem Hintergrund des gestiegenen Einschleppungsrisikos können diagnostische Proben aus dem Inland in den Untersuchungseinrichtungen der Länder mit Methoden untersucht werden, bei denen es nicht zu einer Vermehrung von infektiösem ASPV kommt. Für die entsprechenden Untersuchungsmethoden, d. h. Antikörper-ELISAs und real-time PCRs werden in regelmäßigen Abständen vom NRL Ringversuche angeboten, die eine Qualitätsüberprüfung der eingesetzten Diagnostika erlauben. Positive oder fragliche Befunde sind am FLI abzuklären. Auf Anfrage können standardisierte Probenpanel für die Etablierung der Untersuchungsmethoden zur Verfügung gestellt werden.

1.6 Rechtsgrundlagen

- Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung
- Richtlinie 2002/60/EG des Rates vom 27. Juni 2002 zur Festlegung von besonderen Vorschriften für die Bekämpfung der Afrikanischen Schweinepest (...) in der jeweils gültigen Fassung sowie
- Entscheidung 2003/422/EG der Kommission vom 26. Mai 2003 zur Genehmigung eines Diagnosehandbuchs für die Afrikanische Schweinepest in der jeweils gültigen Fassung

2. Untersuchungsmaterial

Für die Probenahme ist die Entscheidung 2003/422/EG (Diagnosehandbuch) maßgeblich. Die folgenden Ausführungen dienen daher nur der Erläuterung bzw. Konkretisierung des Vorgehens in Deutschland.

Aufgrund der epidemiologischen Situation ist bei Verdacht auf Schweinepest immer auf KSP und ASP zu untersuchen. Es ist zu empfehlen, geeignetes Probenmaterial gekühlt für eine Weiterleitung ans NRL zurückzuhalten.

Die Probenverpackung muss den ADR-Vorschriften entsprechen, auf jeden Fall aber flüssigkeitsdicht sein und äußerlich gut desinfiziert werden (mit kommerziell erhältlichen Desinfektionsmitteln mit Wirksamkeit gegen behüllte Viren, z. B. auf Ameisensäurebasis). Sie darf außerhalb des zuständigen Labors nicht mehr geöffnet werden. Frische Proben sind gekühlt, aber nicht gefroren zu versenden (Hinweis: Falls nur gefroren aufbewahrte Proben zur Verfügung stehen, sind diese im Ausnahmefall einzusenden, da viele Nachweisverfahren mit gewissen Einschränkungen auch bei gefrorenen Proben anwendbar wären.).

Proben zur Bestätigung sind nach Möglichkeit per Kurier (dieser sollte die Sendungsverfolgung erlauben) zum Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems zu schicken und dort telefonisch anzukündigen (0383517-0). Sie sind als biologische Substanzen der Kategorie B (UN3373) zu deklarieren.

Vereinfachte Verfahren können ggf. für Proben (insbesondere trockene Blut tupfer) von Wildschweinen aus freien Gebieten zur Anwendung kommen.

Details zum Versand sind in dem entsprechenden Kapitel der Amtlichen Methodensammlung niedergelegt (Probenversand, Diagnostische Proben).

Bei einem ASP-Verdacht sind einzusenden:

- Serum (möglichst 5 ml je Tier)
- Wo möglich, zusätzlich 10 ml EDTA-Blut.

Hinweis: Empfohlen werden wassergefüllte Kühlakkus, die zu einer Temperatur von etwas über 0 °C führen; Trockeneis ist nicht zu verwenden.

Aus Untersuchungseinrichtungen oder von Schlachthöfen:

- Serum, 1 - 2 ml
- Lymphknoten, insbesondere der inneren Organe sowie Mandibular- und Retropharyngeallymphknoten
- Milz, Tonsillen, Lunge, Niere
- zusätzlich möglich: ungeöffnetes Brustbein **oder ein Oberschenkelknochen**

Blutproben sind von einer größeren Zahl von Tieren einzusenden. Das Diagnose-Handbuch enthält Festlegungen hierzu und auch zur Untersuchung klinisch unauffälliger Kontaktbestände.

Organproben sind möglichst von ausgewählten klinisch kranken bzw. pathologisch auffälligen Tieren einzusenden. Zu den Organproben ist ein Vorbericht über das Tier (Klinik, Pathologie) zu übermitteln.

Bevorzugte Proben von Schwarzwild:

- Serum
- Milz

Für die Untersuchung von Fallwild im Rahmen der passiven Surveillance in freien Gebieten (siehe KSP) eignen sich alternativ in Blut bzw. bluthaltige Körperflüssigkeit getauchte Tupfer (trockene Tupfer, z. B. Genotubes). Diese eignen sich sowohl für den Nachweis von Antikörpern als auch von viralem Genom. Der Arbeitsaufwand im Labor entspricht dem Aufwand für eine Organprobe.

Tupferproben eignen sich ggf. auch für die Untersuchungen in gefährdeten Gebieten. In diesem Fall sind die Einzelheiten mit den zuständigen Einrichtungen abzustimmen. Grundzüge der Tupferbeprobung und -aufarbeitung sind in folgendem Handlungshinweis zu finden: https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/Document_derivate_00004352/Zusatzinfo_Frueherkennung_ASP-WS20140725.pdf.

Afrikanische Schweinepest

Im Falle stark verwesener Tierkörper können Knochen, die die Entnahme von Knochenmark gestatten, eingeschickt werden.

Läsionen, die in der pathologisch-anatomischen Untersuchung betroffener Tiere bzw. beim Aufbrechen von Schwarzwild auffallen können:

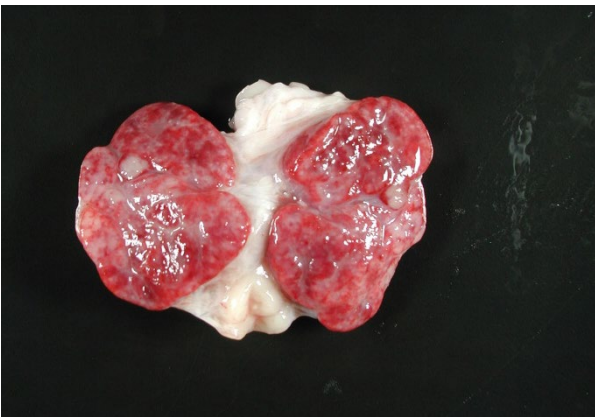


Abbildung 1: Diffuse Blutungen im Mandibularlymphknoten

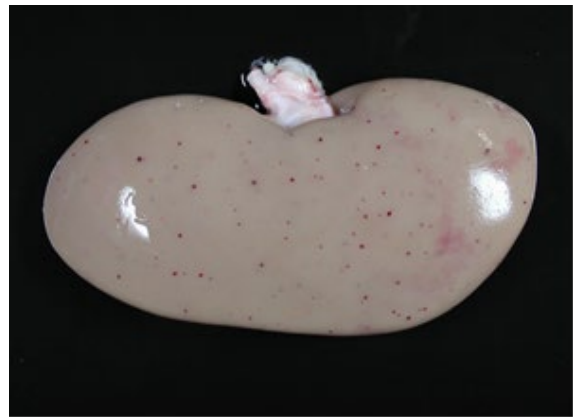


Abbildung 2: Petechien in der Niere



Abbildung 3: Splenomegalie

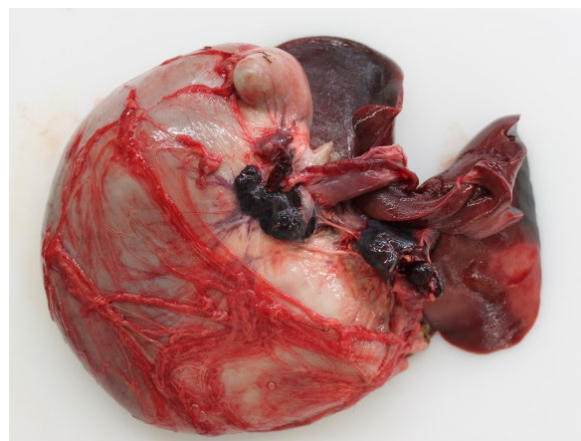


Abbildung 4: Ebenholzfarbene gastro-hepatische Lymphknoten

Weitere Bilder zur Klinik und Pathologie der ASP bei Haus- und Wildschweinen sind auf der Homepage des NRLs zu finden: <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-virusdiagnostik-ivd/referenzlabore/nrl-fuer-asp/nrl-fuer-asp/>.

Für die Einsendung an das NRL ist nach Möglichkeit das Einsendeformular für Probenmaterial zu verwenden. Es befindet sich auf dem Formularserver (https://fms.fli.de/lip/action/invoke.do?id=ivd_EinsendebogenAfrikanischeSchweinepest) und gestattet die einfache Überführung ins LIMS.

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? Tierarten?
- Art des Bestandes (Zucht-, Mast-, Händlerbestand etc.)?
- Bestehen Kontakte zu ASPV-verseuchten Gebieten?
- Bemerkungen und weitere Hinweise auf eine mögliche Erregereinschleppung.

3. Untersuchungsgang

Für die Untersuchung ist die Entscheidung 2003/422/EG (Diagnosehandbuch) maßgeblich. Die folgenden Ausführungen dienen daher nur der Erläuterung bzw. Konkretisierung des Vorgehens in Deutschland.

Die Bestätigung eines Primärfalles hat am FLI zu erfolgen. Dies erfolgt durch den Nachweis von

- ASPV-Genom in Organen, Blut oder Leukozytenkulturen
- infektiösem ASPV aus Organen oder Blut/Serum
- ggf. ASPV Antigen in Organen, Blut oder Leukozytenkulturen
- ASPV-spezifischen Antikörpern

3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR

Der Nachweis von ASPV-Genom erfolgt über zugelassene oder OIE-gelistete real-time PCR-Protokolle (King *et al.*, J Virol Methods. 2003 Jan;107(1):53-61). Diese dienen dem sensitiven Nachweis von ASPV-Genom in Blut-, Serum-, Organ- und Tupferproben sowie Zellkulturüberständen. Die hohe Sensitivität der Testverfahren erlaubt das Zusammenführen (Poolen) mehrerer Proben, wobei die Probenqualität, Praktikabilität, das Untersuchungsziel und die Epidemiologie beachtet werden sollten. Insbesondere im Rahmen des Fallwildmonitorings ergeben sich häufig Situationen, die eine Einzeltestung sinnvoll erscheinen lassen. Dazu gehören geringer Probenanfall, schlechte Probenqualität und Kenntnis über inhibitorische Effekte von Einzelproben.

Afrikanische Schweinepest

Proben von Hausschweinen aus gefährdeten Gebieten, die als Stichprobe eines Bestandes oder einer Schweinepartie im Rahmen der Verbringungsuntersuchungen nach Schweinepestverordnung genommen wurden, sollten aufgrund der geringen angenommenen Virusprävalenz und -last einzeln untersucht werden.

Jüngst am EU Referenzlabor und am NRL durchgeführte erweiterte Untersuchungen zur Poolbarkeit von Schwarzwildproben und Proben mit geringerer Genomlast zeigten, dass Poolgrößen von mehr als fünf Proben zu einem deutlichen Anstieg von falsch negativen Ergebnissen führen können. Die bisher empfohlenen Poolgrößen führen zu einem deutlichen Sensitivitätsverlust (bis zu 30 % Reduktion), so dass eine Zusammenführung von mehr als fünf Proben nach jetzigem Stand nicht zu empfehlen ist. Die in den kommerziellen Kits vorgeschlagenen Poolgrößen von bis zu 20 Proben eignen sich ausschließlich für optimales Probenmaterial und Situationen, in denen von hohen Genomlasten auszugehen ist (klinisch kranke Tiere). Alle Systeme integrieren die Amplifizierung eines internen Kontrollsystems (IC2 DNA) im duplex Assay. Die PCRs eignen sich auch für Materialien, die für die Virusisolierung bzw. den Antigennachweis nicht mehr geeignet sind (z. B. Fallwildproben).

Zeitaufwand für die initiale Testung: ca. ein Tag; positive Ergebnisse sind in einer zweiten, unabhängigen PCR zu überprüfen bzw. durch Sequenzierung des PCR-Produktes abzusichern.

Für die Bestätigung werden am FLI die Protokolle nach Tignon *et al.* (J Virol Methods. 2011 Dec; 178 (1-2):161-70) und Zsak *et al.* (J Clin Microbiol. 2005 Jan; 43(1):112-9) verwendet.

Derzeit sind vier-fünf kommerzielle real-time PCR Systeme in Deutschland zugelassen (zwei drei weitere befinden sich in der Zulassung), die im Rahmen der Ausschlussdiagnostik und des Monitorings auch an den Untersuchungseinrichtungen der Länder Anwendung finden können:

- INgene q PPA (Ingenasa)
- virotype ASFV (Indikal, ehemals Qiagen Leipzig)
- ID Gene ASF Duplex (IDvet)
- RealPCR ASFV (IDEXX)
- SwineFever combi (gerbion)

3.2 Virusisolierung in Makrophagen-/Leukozytenkulturen

Die Anzucht von ASPV erfolgt primär als Hämadsorptionstest. Er dient dem Nachweis von vermehrungsfähigem ASPV aus Blut-, Gewebe- und Tupferproben in primären Blutmonozyten (PBMCs) bzw. daraus generierten Makrophagenkulturen. Es handelt sich um einen Bestätigungstest, der insbesondere im Ausbruchfall zum Einsatz kommt, und im OIE Manual beschrieben ist. Der Test ist bei entsprechender Erfahrung hoch sensitiv, ist jedoch nicht für alle ASPV Isolate aussagekräftig, kann durch bestehende Antikörperreaktionen behindert werden, und muss daher von anderen Testsystemen begleitet werden.

Der Test macht sich den Umstand zunutze, dass es in ASPV-infizierten Leukozytenkulturen zu einer HämadSORPTIONSreaktion kommt, d. h. Erythrozyten lagern sich rosettenartig um infizierte Leukozyten („Himbeeren“). Circa 48 Stunden nach dem Auftreten der HämadSORPTION kommt es zur Lyse der infizierten Zellen. Da kein anderes für Schweine relevantes Virus dieses Phänomen auszulösen vermag, ist der Test als spezifisch für ASPV anzusehen.

Blut-, Gewebe- oder Tupferproben von Schweinen werden nach entsprechender Aufbereitung auf primäre Blutleukozytenkulturen (PBMCs bzw. daraus gewonnene Makrophagen) verimpft. Die infizierten Kulturen sind über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen täglich abzulesen. Im positiven Falle kommt es zu der spezifischen Rosettenbildung (siehe Abbildung 4). Im Regelfall werden mindestens zwei Passagen ange-setzt.

Zeitaufwand: 1. Passage sieben Tage (im klar positiven Falle ca. zwei Tage), 2. Passage ca. sieben weitere Tage

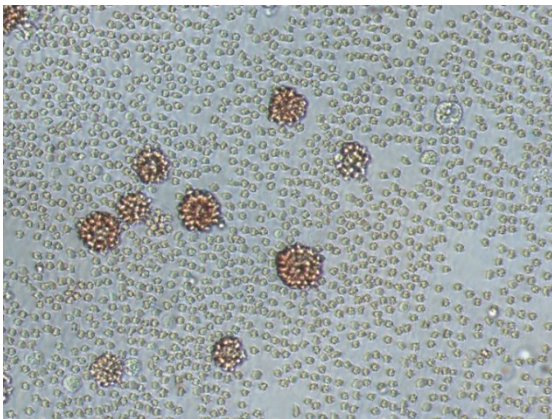


Abbildung 5: Positiver HämadSORPTIONStest 48 Stunden nach Inokulation eines positiven Serums

3.3 Nachweis von ASPV-Antigen

Für den Nachweis von ASPV-Antigen steht ein kommerzieller ELISA zur Verfügung, der jedoch nur in Ausnahmefällen zum Einsatz kommt.

In Kryoschnitten bzw. Milzabklatschpräparaten kann virales Antigen mittels Immunfluoreszenz- oder Immunperoxidasefärbung nachgewiesen werden.

Zeitaufwand: ca. ein Tag

3.4 Nachweis ASPV-spezifischer Antikörper

Für die serologische Diagnostik der ASP stehen derzeit **zweidrei** zugelassene kommerzielle ELISA-Systeme zur Verfügung. Die Testsysteme bedienen sich verschiedener Antigene und werden daher parallel eingesetzt.

Afrikanische Schweinepest

Neben einem Blocking ELISA auf der Basis des p72 (INGEZIM PPA COMPAC, Ingenasa), ist ein indirektes Testsystem verfügbar, das sich einer Antigenmischung aus p72, p62 und p32 (ID Screen® African Swine Fever Indirect ELISA, IDvet) bedient. Darüber hinaus wurde kürzlich ein kompetitiver ELISA auf der Basis des p32 (ID Screen African Swine Fever Competition, IDVet) zugelassen.

Zeitaufwand: ca. ein Tag

Zur Bestätigung stehen Immunoblot- bzw. indirekte Immunperoxidase-Tests zur Verfügung.

Zusätzlicher Zeitaufwand: ein bis zwei Tage

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