

4. RIEMSER DIAGNOSTIKTAGE

5./6. November 2009

Alfried-Krupp-Wissenschaftskolleg Greifswald



und



**Arbeitskreis für veterinärmedizinische
Infektionsdiagnostik (AVID)**

4. Riemser Diagnostiktage

05./06. November 2009

Alfried-Krupp-Wissenschaftskolleg Greifswald

05. November

08:00 Registrierung

08:45 Begrüßung (*T.C. Mettenleiter, Präsident Friedrich-Loeffler-Institut, M. Beer, Leiter Institut für Virusdiagnostik, B. Hoffmann, AVID Vorstand*)

09:00 Neues auf dem Gebiet der Gesetzgebung von Tierseuchen und Zoonosen
(*H-J. Bätza., BMELV, 20 min*)

09:25 §17c Tierseuchengesetz aus der Sicht des AVID (*A. Moss, LAVES Oldenburg, 15 min*)

Stellungnahme der Zulassungsstelle des FLI (*J. Heidrich, FLI Insel Riems*) und Diskussion

(*Moderation: T.C. Mettenleiter*)

10:00 Tee-/Kaffeepause

10:45 Themenkomplex „Berichte aus den Referenzlaboratorien“ (*Moderation: H. Schirrmeier*)

- Neue Vorgaben der Europäischen Union zur Diagnostik von Fischseuchen (*D. Fichtner, FLI Insel Riems, 15 min*)
- Untersuchungen zum Wirtsspektrum der Infektion mit dem Koi-Herpesvirus (KHV) (*S. Bergmann, FLI Insel Riems, 15 min*)
- Neuigkeiten aus dem NRL für BLV und CAE/Maedi (*T. Vahlenkamp, FLI Insel Riems, 15 min*)
- Tauben als letzte Bastion der Newcastle Disease in Deutschland? – Untersuchungen zu auftretenden Aviären Paramyxoviren-1 von Tauben (*C. Grund, FLI Insel Riems, 15 min*)
- Rindertuberkulose: neue Verordnung, alte Probleme (*Ch. Menge, FLI Jena, 15 min*)

12:15 Mittagsimbiss

13:15 Themenkomplex „Influenza-A-Infektionen“ (Moderation: T. Harder)

- H1N1/2009: Informationen aus dem Nationalen Referenzzentrum des RKI (B. Schweiger, RKI, 15 min)
- H1N1/2009: Aktuelle Situation und Schlussfolgerungen aus der Sicht der Veterinärmedizin (T. Vahlenkamp, FLI Insel Riems, 15 min)
- H1N1/2009: Tierexperimentelle Studien und Interpretationen (E. Lange, FLI Insel Riems, 15 min)
- Bewertung des nationalen Ringversuches AI/ND 2009 und Diagnostik H1N1/2009 (T. Harder und C. Grund, FLI Insel Riems, 15 Min.)
- Task-force-Effizienz in Zeiten pandemischer Bedrohungen (Ch. Eckert, Metabion, 10 min)

14:45 Themenkomplex „Neue Diagnostikmethoden“ (Moderation: D. Höper)

- Einsatz der MALDI-TOF MS bei der Diagnostik von Bakterien und Pilzen (M. Erhard, AnagnosTec GmbH, 15 min)
- DNA-Mikroarrays in der Diagnostik – Stand und Perspektiven (K. Sachse, FLI Jena, 15 min)
- Direkt PCR – gehört die Nukleinsäureextraktion der Vergangenheit an? (B. Hoffmann, FLI Insel Riems, 15 min)
- IBRgE-Diagnostik aus Tankmilch – möglich? (C. Schröder, LDL, 10 min)
- Anwendbarkeit imperfekter diagnostischer Tests mit cut-off's in Abhängigkeit von epidemiologischen Anforderungen und Gegebenheiten (A. Fröhlich, FLI Wusterhausen, 10 min)

16:00 Tee-/Kaffeepause

16:45 Themenkomplex „Berichte aus der Laborpraxis“ (Moderation: H.-H. Schöttker-Wegner)

- Derzeitige Erkenntnisse zum BVD-Nachweis aus Ohrstanzen im Rahmen einer Studie am LGL (A. Kupča und J. Drdlicek, LGL Erlangen, 15 min)
- Automatisierungslösungen und Datenmanagement bei Rinderblut- und Ohrstanzproben mit Hilfe der HIT-Datenbank (M. Saßerath, CVUA Krefeld, 20 min)
- *Automatisiertes Sample Management* in Veterinäruntersuchungsstellen (M. Frey, HAMILTON Robotics GmbH, 10 min)
- Diagnostik jenseits des Infektionsnachweises am Beispiel von PI3-Virus (F. Wiescher, TGD Grub, 10 min)
- Simultaner Nachweis von Infektionserregern beim Rind mit der Multiplex-Real-time-PCR (W. Gaede, LAV Sachsen-Anhalt, 15 min)
- Knochenmarkaplasie in Verbindung mit hämorrhagischer Diathese bei Kälbern in Deutschland: Untersuchungen zur Ätiologie (M. Halami, Universität Leipzig, 10 min)

20:00 Gemeinsames Abendessen im Gasthof „Zur Sonne“

06. November

09:15 Themenkomplex „Schweinepest“ (Moderation: L. Haas)

- Aktuelle Situation in Deutschland und Europa (*Ch. Staubach, FLI Wusterhausen, 20 Min.*)
- Diagnostik und molekulare Epidemiologie im Kontext der aktuellen KSP-Situation (*S. Blome, FLI Insel Riems, 20 min*)
- HerdChek CSFV Ag Serum: Ein KSPV-Antigen-ELISA mit hoher Sensitivität (*Ch. Schelp, IDEXX, 10 min*)

10:15 Tee-/Kaffeepause

11:00 Themenkomplex „Emerging Diseases – Zoonosen – durch Vektoren übertragene Tierseuchen“ (Moderation: M. Beer)

- *Emerging Diseases* – Neue Erreger und mögliche Reservoirs (*F. Leendertz, RKI, 20 min*)
- Aktuelle BTV-Situation in Deutschland und Europa (*F. Conraths, FLI Wusterhausen, 15 min*)
- Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit von inaktivierten BTV-8-Impfstoffen nach homologem und heterologem Challenge (*M. Eschbaumer, FLI Insel Riems, 15 min*)
- Neues zu BTV aus dem Nationalen Referenzlabor (*B. Hoffmann, FLI Insel Riems, 15 min*)
- Entwicklung eines Real-time-PCR-Assays zum Nachweis des BTV (*H. Marquardt, Qiagen, 5 min*)
- Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen – ein Informations- und Servicenetzwerk (*A. Wiethölter, FLI Insel Riems, 15 min*)
- Molekulare Detektion von Arboviren (*M. Eiden, FLI Insel Riems, 15 min*)
- Neuer ELISA zur Detektion der bovinen Besnoitiose (*A. Harris, PRIONICS, 10 min*)

13:15 Abschlussdiskussion und Fragen zu aktuellen Problemen

14:00 Voraussichtliches ENDE der Veranstaltung – Mittagsimbiss

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

§ 17c Tierseuchengesetz aus der Sicht des AVID

A. Moss

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz
und Lebensmittelsicherheit, Veterinärinstitut Oldenburg

Im § 17c Tierseuchengesetz wird für Sera, Impfstoffe und Antigene und für Nachweismethoden gefordert, dass sie, bevor sie in den Verkehr gebracht oder angewendet werden, zugelassen worden sind. Zuständig ist das Friedrich-Loeffler-Institut soweit nicht das Paul-Ehrlich-Institut zuständig ist. In gewissen Fällen, z. B. Notstand, sind Ausnahmen mit einer Ausnahmegenehmigung durch die zuständige Landesbehörde möglich.

Im Bereich der Impfstoffe gibt es praktisch fast keine Impfstoffe, die in den Verkehr gebracht oder angewendet werden, die nicht durch das Paul-Ehrlich-Institut zugelassen sind oder über eine entsprechende Ausnahmegenehmigung verfügen.

Im Bereich der Nachweismethoden sieht es etwas anders aus. Dort gibt es einige zugelassene Nachweismethoden und einige Methoden werden mit einer Ausnahmegenehmigung angewendet. Aber ein großer Teil an Nachweismethoden wird ohne Zulassung und ohne Ausnahmegenehmigung in den Verkehr gebracht und angewendet, obwohl die entsprechende Tierseuche die Begriffsbestimmung in § 1 Tierseuchengesetz erfüllt und z. T. vom Paul-Ehrlich-Institut für diese Tierseuche ein Impfstoff zugelassen wurde.

Obwohl Impfstoffe und Nachweismethoden im § 17c im Zusammenhang geregelt werden, kommt es hier zu einer völlig unterschiedlichen Handhabung. Diese unterschiedliche Handhabung der Industrie und der diagnostischen Labors sowie der zuständigen Überwachungsbehörden führt dazu, dass sich viele Diagnostikerhersteller und Labordiagnostiker – vorsichtig formuliert – im rechtsfreien Raum bewegen.

Dieser Zustand ist zumindest für die Labordiagnostiker sehr unbefriedigend, sodass es aus der Sicht des AVIDs Sinn machen würde, einige Änderungen am § 17c vorzunehmen:

- Impfstoffe und Nachweismethoden sind grundverschieden und sollten deshalb nicht im direkten Zusammenhang geregelt werden.
- Der Anwendungszwang sollte auf diagnostische Nachweismethoden beschränkt bleiben. Anwendung im Rahmen von wissenschaftlichen Untersuchungen, z. B. Doktorarbeiten, Validierungsstudien, Betatestung etc. sollte frei bleiben. Gegenwärtig kennt der § 17c keine Beschränkung des Anwendungszwangs.
- Der § 17c sollte einige Alternativen, z. B. Methodenempfehlungen der nationalen Referenzlabors, zu zugelassenen kommerziellen Nachweismethoden ausweisen, um einem diagnostischen Notstand vorzubeugen und um diagnostische Methoden zur Abklärung unklarer Ergebnisse zur Verfügung zu stellen.

In dem Vortrag werden entsprechende Vorschläge für eine Änderung des § 17c Tierseuchengesetz gemacht.

**4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009**

Neue Vorgaben der Europäischen Union zur Diagnostik von Fischseuchen

D. Fichtner, S. M. Bergmann, U. Fischer, G. Kotterba und H. Schütze

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems

Die „Richtlinie 2006/88/EG des Rates vom 24. Oktober 2006 mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und für Aquakulturerzeugnisse sowie zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten“ wurde mit der „Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008“ in nationales Recht überführt.

Für die im Anhang IV, Teil 2 der EU-Richtlinie 2006/88/EG aufgeführten exotischen und nicht exotischen (heimischen) Krankheiten der Fische, Weich- und Krebstiere wurde in Deutschland die Anzeigepflicht festgelegt. Am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) wurden für die neuen anzeigepflichtigen Krankheiten Nationale Referenzlaboratorien (NRL) etabliert (Tab.1).

Tabelle 1:
Nationale Referenzlaboratorien für die anzeigepflichtigen Krankheiten aquatischer Tiere

Aquatische Tiere	Anzeigepflichtige Krankheiten (E= exotisch, H= nicht exotisch/heimisch)	Leiter des NRL am FLI
Fische	Epizootische hämatopoetische Nekrose (E) Epizootisches ulzeratives Syndrom (E) Virale hämorrhagische Septikämie (H) Infektiöse hämatopoetische Nekrose (H) Koi-Herpes-Viruserkrankung (H) Infektiöse Anämie der Lachse (H)	Dr. Heike Schütze Günter Kotterba Dr. Dieter Fichtner Dr. Dieter Fichtner Dr. Sven M. Bergmann Dr. Heike Schütze
Weichtiere	Infektion mit <i>Bonamia exitiosa</i> (E) Infektion mit <i>Perkinsus marinus</i> (E) Infektion mit <i>Microcytos mackini</i> (E) Infektion mit <i>Marteilia refringens</i> (H) Infektion mit <i>Bonamia ostreae</i> (H)	Leiter NRL für Muschelkrankheiten: Dr. S. M. Bergmann
Krebstiere	Taurasyndrom (E) Yellowhead disease (E) Weißpünktchenkrankheit der Krebse (H)	Leiter NRL für Krebskrankheiten: Dr. Uwe Fischer

Die wichtigsten Maßnahmen in der neuen Fischseuchen-VO zur Verhütung und Bekämpfung der Seuchen bei Fischen, Muscheln und Krebsen sind:

- die Genehmigungspflicht bzw. die Registrierung der Aquakulturbetriebe,
- die Buchführungspflicht für die Aquakulturbetriebe,
- die passive, aktive und gezielte Überwachung,

- die Zuordnung der Aquakulturbetriebe in die Kategorien von I (seuchenfrei) bis V (verseucht),
- die Bildung von Schutzgebieten im Sinne des Tierseuchengesetzes, die seuchenfreien Zonen oder Kompartimenten in der Richtlinie 2006/88/EG entsprechen,
- die Erstellung von Überwachungs- und Tilgungsprogrammen oder
- die Festlegung von Sperr- und Überwachungsgebieten nach amtlicher Feststellung einer exotischen oder nicht exotischen Seuche.

Nähere Einzelheiten der Richtlinie 2006/88/EG werden von der Europäischen Kommission in Durchführungsrechtsakten festgelegt. Eine davon ist der Entwurf des „Diagnostik-Handbuches“ (COMMISSION DECISION of Diagnostic Manual for certain aquatic animal diseases) mit Festlegungen zur Überwachung und Diagnostik vorerst der nicht exotischen Seuchen. Auf die Änderungen zur bisherigen Verfahrensweise bei der Diagnostik von Fischseuchen wird hingewiesen.

4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009

**Untersuchungen zum Wirtsspektrum der Infektion mit dem
Koi-Herpesvirus (KHV)**

S. M. Bergmann¹, D. Fichtner¹, H. Schütze¹, R. Panicz²
und J. Kempter²

¹Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
NRL KHV-I, Insel Riems

²West-Pommeranische Technologische Universität, Labor für Fischgenetik, Szczecin, Polen

Trotz intensiver Maßnahmen bei der Bekämpfung der KHV-I in den polnischen Karpfenbeständen, kommt es immer wieder zu massiven Ausbrüchen. Da oft keine Karpfen zugekauft wurden, mussten die Ursachen anderweitig zu finden sein. Um einige Aspekte der Infektion abzuklären, wurden Fische aus der Wildpopulation um Karpfen-Teichwirtschaften in den Zuflüssen der Oder nach dem elektrischen Abfischen auf KHV untersucht. Das KHV wurde hauptsächlich in Karpfenartigen wie z. B. in 52 % der Giebel (*Carassius gibelio*), in 35 % der Schleien (*Tinca tinca*) oder in 40 % der Brasseln (*Abramis brama*) mittels PCR und Nested-PCR gefunden.

KHV-PCR positive Schleien und Zährten (*Vimba vimba*) aus Nordpolen wurden mit SPF-Karpfen (University of Wageningen, NL) bei unterschiedlichen Wassertemperaturen kohabitiert. Obwohl die Karpfen keinerlei Anzeichen einer KHV-I zeigten, konnte das KHV nach 7 – 21 Tagen in Kiemen bzw. im Darm der Tiere gefunden werden.

Die Gebiete, in denen sich die Karpfenproduktion in Polen konzentriert, befinden sich jedoch im Süden des Landes. Auch hier traten in Farmen ohne Zukauf mit eigener Quelle KHV-I-Ausbrüche in Karpfen zwischen 2002 und 2008 auf. Daher wurden wir gebeten, uns u. a. mit den Teichmuscheln (*Anodonta sp.*) in Bezug auf die KHV-I zu beschäftigen. Proben einzelner Muscheln (Abstriche, Organproben), die bis zu 1,5 m tiefer aus den Teichen gewonnen wurden, zeigten positive oder verdächtige Signale in der KHV-PCR bzw. Nested-PCR.

Um dieses abzuklären, wurden Muscheln im Süden Polens gesammelt und in die Aquarienanlage der Universität Szczecin verbracht. Hier wurden sie für mindestens 7 – 14 Tagen gesäubert. Täglich wurde Wasser gewechselt, es erfolgte keine Fütterung. Für Untersuchungen wurden die Muscheln bei unterschiedlichen Temperaturen mit SPF-Karpfen unterschiedlichen Alters kohabitiert. Während bei den K1-Karpfen keine KHV-I ausgelöst werden konnte, kam es bei jüngeren Tieren schon ab dem 5. Tag nach der Kohabitation mit den Muscheln zu massiven Ausbrüchen der KHV-I bei Wassertemperaturen zwischen 17 und 23 °C. In allen gestorbenen Karpfen, aber auch in einem Großteil der überlebenden Tiere und in den Muscheln selbst, konnte das KHV mittels verschiedener PCR und Nested-PCR nachgewiesen und über die Sequenzanalyse der Amplifikate bestätigt werden.

Weitere Untersuchungen, wie der direkte Nachweis des KHV im Gewebe mittels *In-situ*-Hybridisierung oder iFAT mit monoklonalen Antikörpern, sind geplant bzw. werden derzeit durchgeführt.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Neuigkeiten aus dem NRL für BLV und CAE/Maedi

K. Wink-Kruschke und T. W. Vahlenkamp

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems

Die Prävalenz der **Enzootischen Rinderleukose** (ERL) ist zwar heute in vielen Ländern West-Europas durch erfolgreiche Sanierungsprogramme drastisch zurückgegangen, weltweit ist sie aber noch immer sehr verbreitet und vor allem in den neuen Mitgliedsstaaten der EU, in Ost-Europa, im Nahen Osten, in Asien, Australien sowie Nord- und Südamerika von Bedeutung. In Deutschland ist trotz der Weiterentwicklung und qualitativen Verbesserung der diagnostischen Systeme zum Antikörpernachweis aus Serum oder Milch und eines seit Jahren fest etablierten Untersuchungsmanagements die Eradikation des bovinen Leukämievirus (BLV) bis heute nicht realisiert worden. Zur Abklärung serologisch-fraglich reagierender Proben unterschiedlicher geographischer Herkunft wurde zusätzlich zur etablierten klassischen, auf dem *env*-Gen basierenden PCR eine Real-Time-PCR entwickelt, die Sequenzen des *pol*-Gens als Zielsequenz hat.

Die Untersuchung zeigte, dass die Primer-Sonden Kombinationen basierend auf dem *pol*-Gen alle Proben erkennen konnte, die mit der *env*-PCR positiv waren. Dies umfasste BLV-Proben aus Europa, Afrika und Amerika. Von den bisher beschriebenen sieben BLV-Subtypen standen in dem untersuchten Probenmaterial fünf Subtypen zur Verfügung, die alle mit der *pol*-PCR detektiert wurden. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Sensitivität und Spezifität. PBMC-DNA-Proben BLV-negativer Tiere, sowie die DNA-Proben von BFV- und BIV-infizierten Zellen waren in der *pol*-PCR negativ.

Die serologischen Untersuchungen zum Nachweis der **Caprinen Arthritis/Enzephalitis** und **Maedi/Visna** zeigten in diesem Jahr viele positive Ergebnisse bei einem zugelassenen Test, die mit anderen Tests nicht bestätigt werden könnten. Es zeigte sich, dass diese offensichtlich falsch positiven Ergebnisse insbesondere bei Tieren auftraten, die zuvor gegen BTV geimpft wurden. Eine plausible Erklärung für die beobachteten Reaktionen konnte jedoch nicht gegeben werden. Der Testanbieter hat daraufhin seine Kunden informiert und ein alternatives Testsystem empfohlen.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Tauben als letzte Bastion der Newcastle Disease in Deutschland? – Untersuchungen zu auftretenden Aviären Paramyxoviren-1 von Tauben

C. Grund

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
OIE und Nationales Referenzlabor für Newcastle Disease
Institut für Virusdiagnostik, Insel Riems

Die atypische Geflügelpest oder Newcastle Disease (ND) ist eine hoch akut und seuchenhaft verlaufende Infektionskrankheit, die mit hohen Verlusten einhergeht. Besonders empfänglich für die Erkrankung sind von den als Wirtschaftgeflügel gehaltenen Vögeln Hühner und Puten. Als empfänglich für die Infektion mit dem auslösenden Agens, dem Aviären Paramyxovirus des Serotyp 1 (APMV 1; NDV), werden allerdings alle Vertreter der Klasse Aves angesehen. Bei Tauben lagen lediglich Berichte über ein sporadisches Auftreten von Erkrankungen vor.

Dies änderte sich Anfang der 80er Jahre mit einer seuchenartigen Ausbreitung der Paramyxovirose in der Taubenpopulation, die heute als weltweit verbreitet angesehen werden kann. Ursache für die Änderung der epidemiologischen Situation wird eine spezielle APMV-1-Variante, der sogenannte Taubentyp (PPMV-1), verantwortlich gemacht. PPMV-1 weist antigenetische Besonderheiten auf und lässt sich mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern von anderen APMV-1 Stämmen differenzieren. Phylogenetisch wird PPMV-1 in den Genotyp VIb eingeordnet. Die überwiegende Mehrzahl der PPMV-1-Isolate sind virulent und als mesogene Pathotypen einzustufen, mit einem intracerebralen Pathogenitätsindex von $> 0,7$ und $< 1,5$.

In Deutschland wird regelmäßig PPMV-1 bei Tauben nachgewiesen. In den Jahren 2007 und 2008 wurden 19 bzw. 16 APMV-1-Isolate von Tauben aus Deutschland an das NRL eingesandt und im Jahr 2009 gelangten 12 Isolate zur Untersuchung. Die Isolate konnten alle als PPMV-1 identifiziert werden und waren dem Genotyp VI zuzuordnen, stellen sich allerdings phylogenetisch uneinheitlich dar. Im Bereich der proteolytischen Spaltstelle des Fusions-Proteins wiesen die PPMV-1-Isolate aus Tauben eine polybasische Sequenz auf, was einem meso-/velogenen Pathotypen entspricht und bei Geflügel anzeigespflichtig wäre.

Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in Bezug auf die Leistungsfähigkeit der molekularen Diagnostik diskutiert als auch in Bezug auf die rechtliche Relevanz der Befunde.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Rindertuberkulose – neue Verordnung, alte Probleme

C. Menge

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für molekulare Pathogenese, Jena

Die Rindertuberkulose (Tb) ist eine chronische Infektionskrankheit, die durch *Mycobacterium (M.) bovis* und *M. caprae* hervorgerufen wird. Nach aerogener oder alimentärer Infektion entwickelt sich eine granulomatöse Entzündung mit knötchenförmigen Veränderungen (Tuberkel) an der Eintrittspforte und in den regionären Lymphknoten (Primärkomplex). Diese Veränderungen finden sich je nach Infektionsweg an den Kopflymphknoten, im Respirations- oder im Gastrointestinaltrakt. Bei der Frühgeneralisation bilden sich granulomatöse Läsionen auch in verschiedenen Organen, u. a. der Leber, der Niere oder an den serösen Häuten (Miliartuberkulose). Die chronische Organtuberkulose betrifft meist ein Organ, z. B. die Lunge. In der Niederbruchsphase kann eine Spätgeneralisation auftreten.

M. bovis und das sehr nah verwandte *M. caprae* haben das weiteste Wirtsspektrum unter den Erregern des *M. tuberculosis*-Komplexes und stellen damit Zoonoseerreger dar. Alimentäre Infektionen des Menschen mit *M. bovis* und *M. caprae* sind Teil der Tb-Pandemie.

Laut Richtlinie 64/432/EWG ist ein Mitgliedstaat anerkannt tuberkulosefrei, wenn mindestens 99,9 % der Rinderbestände in sechs aufeinanderfolgenden Jahren den Status der amtlich anerkannten Tuberkulosefreiheit erlangt haben. Deutschland ist seit 1997 amtlich frei von Rindertuberkulose. Die Infektion wurde jedoch nicht vollständig getilgt. Seit 1995 wurden jährlich zwischen 4 und 10 Fälle, vor allem in Gebieten mit hoher Rinderdichte, ermittelt.

Die Diagnostik der Rindertuberkulose erfolgt *intra vitam* durch indirekte Nachweismethoden (einfacher oder simultaner Hauttest, Interferon-gamma-Test). *Post mortem* werden direkte Nachweisverfahren eingesetzt (kulturelle Anzüchtung der Erreger aus Organmaterial bzw. Direktnachweis in Verdachtsproben mittels PCR). Seit 1997 erfolgt die Überwachung des Tuberkulosegeschehens fast ausschließlich im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung. Dem Nachweis bei der Schlachtkörperuntersuchung sind jedoch Grenzen gesetzt, da nur wenige Lokalisationen am Tierkörper und an den Organen untersucht werden und die häufig sehr kleinen Herde leicht übersehen werden.

Im Jahr 2008 ließ ein Tuberkulose-Geschehen in Nordwestdeutschland die Besorgnis aufkommen, dass sich die Infektion in Deutschland wieder ausbreiten könnte. Bei der Fleischschau eines Rindes anlässlich einer Hausschlachtung wurde der Schlachtkörper wegen erheblicher sinnfälliger Veränderungen als untauglich beurteilt. In Proben dieses Tieres konnte labordiagnostisch *M. bovis* nachgewiesen werden. Bei der nachfolgenden Tuberkulinisierung des Gesamtbestandes reagierten ca. 60 % der Rinder im Hauttest positiv. Auch in 11 der ermittelten Kontaktbetriebe wurden mittels Hauttest positive Tiere identifiziert. Die Einschleppung der Erkrankung erfolgte i. d. R. durch Tierzukauf. Bei zwei Beständen konnten Weidekontakte als Einschleppungsweg identifiziert werden. Infizierte Tiere können

seit 2003 aus dem mutmaßlichen Indexbestand in die Betriebe mit Sekundärausbrüchen gehandelt worden sein. Die Infektion ist jedoch bis Februar 2008 weder im Indexbetrieb noch in den Kontaktbetrieben erkannt worden. Das Beispiel zeigt, dass die zwischen 1997 und 2009 vorgeschriebenen Überwachungsmaßnahmen eine mögliche Ausbreitung der Rindertuberkulose nicht rechtzeitig anzeigen.

Diese Erfahrungen haben zu einer Überarbeitung der Rindertuberkulose-Verordnung im Jahr 2009 Anlass gegeben. Entgegen ursprünglicher Überlegungen wurde der Ansatz der Wiedereinführung der flächendeckenden Untersuchung der Bestände wieder aufgegeben. Vor dem Hintergrund der Limitationen der heute möglichen Diagnostik steht jedoch zu befürchten, dass die aktuellen Überwachungsmaßnahmen langfristig die Wiederausbreitung der Infektion nicht mit ausreichender Sicherheit verhindern können.



Arbeitskreis für veterinärmedizinische
Infektionsdiagnostik (AVID)

**4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009**

H1N1/2009/2009: Informationen aus dem Nationalen Referenzzentrum des RKI

B. Schweiger

Robert Koch-Institut Berlin, Nationales Referenzzentrum für Influenza (NRZ Influenza)

**4. Riemser Diagnostiktag
5./6. November 2009**

**Influenza H1N1/2009: Aktuelle Situation und Schlussfolgerungen
aus Sicht der Veterinärmedizin**

E. Lange und T. W. Vahlenkamp

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems

Das pandemische Virus erwies sich als Reassortante aus Influenzaviren aviären, humanen und porcinen Ursprungs. Der Ursprung dieser Reassortante ist nach wie vor ungeklärt. Die Sequenzen mit größten Homologien (94 bis 97 %) stammen je nach Gensegment aus den Jahren 1992 – 2004.

Da das Hämagglutinin- und Neuraminidase-Gen von nordamerikanischen bzw. eurasischen Influenzaviren stammt, ist jedoch anzunehmen, dass das Schwein bei der Reassortierung eine Rolle gespielt hat.

Momentan zirkuliert das Influenzavirus A/H1N1/2009 weltweit in der Humanmedizin. Mittlerweile gibt es allerdings einige Berichte, die Übertragungen des Virus vom Mensch zum Schwein und z. T. auch vom Schwein zum Mensch beschreiben. Diese stammen aus Amerika (Kanada, Argentinien, USA), Australien, Asien (Singapore, Japan) und Europa (Norwegen, Nord-Irland, Irland, Island). Für die infizierten Betriebe wurde in allen Fällen ein grundsätzliches Verbringungsverbot verfügt. Nach Abklingen der klinischen Symptome wurden diese Maßnahmen in den meisten Fällen wieder aufgehoben.

Neben Berichten über Infektionen bei Schweinen gibt es aus Chile und Kanada auch Nachrichten, dass Infektionen von Truthühnern beobachtet wurden. Auch wenn einzelne Berichte keine Schlussfolgerung über mögliche Eintragsursachen zulassen und z. T. die Art des Untersuchungsmaterials und die durchgeführten Untersuchungen nicht näher beschrieben sind, müssen wir mit weiteren Übertragungen des in der Humanmedizin pandemisch auftretenden Virus rechnen.

Solange der Kontakt mit infizierten Personen als einzig gesicherte Infektionsquelle von Schweinen angesehen wird, muss auf eine strikte Einhaltung der Biosicherheit in den Betrieben geachtet werden und der Zugang zu Beständen nur für gesundes Personal möglich sein. Zum Umgang mit infizierten Schweinen hat die EU nach Konsultation aller Mitgliedsstaaten einen Leitfaden verfasst, in dem davon ausgegangen wird, dass 7 Tage nach Abklingen der klinischen Symptome die Virusausscheidung vernachlässigbar ist und die Tiere wieder gehandelt werden dürfen. Weitere Maßnahmen für einen individuellen Fall werden jedoch von den Mitgliedsstaaten separat festgelegt werden.

**4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009**

Influenza H1N1/2009: Tierexperimentelle Studien und Interpretationen

E. Lange

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems

Im April 2009 wurden Influenza-A/H1N1-Infektionen bei Patienten in Mexiko und den USA nachgewiesen, die durch ein bislang nicht beschriebenes Influenza-A/H1N1-Virus verursacht wurden. Sequenzanalysen zeigten, dass das Genom des Virus Gensegmente aviären, humanen und porcinen (nordamerikanische und eurasische Stämme) Ursprungs aufwies (Cohen, 2009; Garten et al., 2009).

Für Untersuchungen zur Virusreplikation, Klinik sowie Virusübertragung bei Schweinen wurden intranasale Infektionsexperimente mit Influenzavirus A/Regensburg/D6/09/H1N1 durchgeführt. Ein Tag nach der Infektion wurden als Kontakttiere Influenzavirus-naive Schweine und Hühner dazugestellt.

Die Tiere wurden täglich termometriert, klinisch beobachtet und beprobt. Bei den infizierten Schweinen verlief die Klinik generell mild. Als Symptome wurde eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens (vermehrtes Liegen) sowie Fieber, Niesen, Nasenausfluss und Durchfall beobachtet. Ab 3. Tag nach Zustellung konnten die Symptome auch bei den Kontaktschweinen registriert werden. Die Futteraufnahme war zu keinem Zeitpunkt des Versuches beeinträchtigt. Die Nasenabstriche der infizierten Schweine waren mittels Real-Time-RT-PCR ab Tag 1 p. i. positiv. Die Nasenabstriche der Kontaktschweine waren ab Tag 2 nach Zustellung in der RT-PCR positiv. Im NP-ELISA und einem HA-H1-spezifischen-Antikörper-ELISA konnten ab Tag 7 p. i. Antikörper nachgewiesen werden. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellpopulationen expandierten zwischen Tag 3 und 7 p. i. Bei den Kontakthühnern konnte keine Virusausscheidung, keine Klinik und keine Serokonversion festgestellt werden.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Bewertung des nationalen Ringversuches AI/ND 2009 und Diagnostik H1N1/2009

C. Grund und T. Harder

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Virusdiagnostik, Insel Riems

An einem bundesweit durchgeführten Ringversuch des FLI zur Diagnostik von Infektionen mit aviären Influenzaviren (AIV) sowie Newcastle Disease Virus (NDV) beteiligten sich 37 Institutionen, darunter fünf privatrechtlich organisierte Laboratorien. Es wurden Proben zur Antigenidentifizierung (n=2), zum RNA-Nachweis (n=9) sowie zur Antikörperdetektion (n=8) versandt.

Antigencharakterisierung. Es wurde lyophilisiertes Antigen eines AIV-H5N1-Stammes niedriger Pathogenität (LP) sowie eines NDV-Stammes (Ulster) versandt. Von den 24 eingesandten Ergebnissen mussten lediglich ein falsch negatives NDV-Ergebnis sowie zwei falsch positive AIV-Ergebnisse (zusätzlicher Nachweis von H7-Antigen) als abweichend registriert werden.

RNA-Detektion. Es wurden Proben einer \log_{10} -Verdünnungsreihe (10^{-3} bis 10^{-8}) eines LP-AIV-H5N1-Stammes, ein NDV-Stamm (Ulster; 10^{-3}) sowie virusnegative Allantoisflüssigkeit versandt. Alle virushaltigen Proben wurden vor dem Versand chemisch inaktiviert. Die Mehrzahl der Teilnehmer, die die vom FLI empfohlenen Methoden der Real-Time-RT-PCR (rRT-PCR) einsetzten, erzielte unabhängig von der verwendeten sehr breiten Palette an RNA-Isolierungsmethoden und unterschiedlicher rRT-PCR „Chemie“ gute bis sehr gute Ergebnisse. Teilnehmer, die konventionelle RT-PCR oder nicht zugelassene, kommerziell vertriebene PCR-Kits einsetzten, stießen dagegen auf z. T. erhebliche Sensitivitätsprobleme.

Antikörperdetektion. Es wurden drei Feldseren von Puten aus einem H5N3-Ausbruchsgeschehen in Niedersachsen sowie Referenzseren des NRL (3 SPF-Seren, 1 Huhn-anti-NDV-H5-Rekombinante) versandt. Insgesamt beteiligten sich 30 Einrichtungen an den serologischen Untersuchungen, wobei die Mehrzahl einen Hämagglutinationshemmtest (HAH) gegen mindestens ein H5-, H7- und NDV-Antigen durchführte. Lediglich ein falsch positives H7-Ergebnis wurde registriert. Allerdings wurden erhebliche HAH-Titerschwankungen, verbunden mit einer geringen Sensitivität, beobachtet. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die verwendeten Antigene zurückzuführen, die keine optimale Passgenauigkeit zu den nachzuweisenden Antikörpern besaßen. Bei den eingesetzten ELISA-Verfahren (fünf verschiedene, zugelassene Kits) ergaben sich überwiegend korrekte Resultate. Diese Ergebnisse verdeutlichen die prinzipielle Leistungsfähigkeit des ELISA, verweisen aber auch auf die Limitationen bei Anwendung spezies-spezifischer Tests (Huhn- vs. Putenseren).

Der Ringversuch belegt die Leistungsfähigkeit der AI- und ND-Diagnostik in den beteiligten Laboren. Insbesondere die Antigencharakterisierung mittels HAH- und der RNA-Nachweis durch FLI-empfohlene rRT-PCR-Methoden, die auch konform zum Diagnostikhandbuch AI der EU sind, verliefen in hohem Maße erfolgreich. Gleichzeitig zeigte sich, dass der Einsatz nicht zugelassener, kommerziell vertriebener PCR-Kits sowie der konventionellen RT-PCR ein erhebliches Risiko für die Erstellung falsch negativer Ergebnisse bedeuten kann.

Die serologischen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der beim HAH eingesetzten Antigene. Neben den im EU-Diagnostikhandbuch spezifizierten Antigenen ist daher z. B. im Rahmen von Umgebungsuntersuchungen bei Ausbrüchen, die Verwendung eines homologen Antigens dringend anzustreben. Die Charakterisierung *aller* von den Untersuchungseinrichtungen erzielten Isolate durch das NRL bietet die Möglichkeit, bereits im Vorfeld zirkulierenden Varianten zu erfassen und in die laufende Diagnostik einfließen zu lassen.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Task-force-Effizienz in Zeiten pandemischer Bedrohungen

C. Eckert

metabion international AG, Planegg/Martinsried

Seit Bekanntwerden des Ausbruchs der sogenannten Schweinegrippe im April diesen Jahres in Mexiko formierten sich lokale, nationale und internationale Task-Force-Einheiten zur Vorbereitung auf und Bekämpfung einer drohenden und schließlich ausgerufenen Pandemie (Phase 6 der WHO Warnskala für Pandemien: **Wirkungsvolle und fortwährende Übertragung vom Menschen zum Menschen**). Jede Phase ist mit Empfehlungen und Maßnahmen verbunden, die von der WHO, der internationalen Gemeinschaft und den Länder-Regierungen in Zusammenarbeit mit Forschung und Industrie ausgeführt werden sollen. Tatsächlich und glücklicherweise verursachte das „Schweinegrippe-Virus“ jedoch bislang nicht das Eintreten einer Pandemie, die per definitionem „eine Krankheit, die sich schnell über ganze Landstriche, Länder und Kontinente ausbreitet, sodass die öffentliche Ordnung gestört und die Krankenhäuser überfüllt sind“ beschreibt. Die Konsequenz aus einer zwar raschen Verbreitung trat bislang noch nicht ein – die öffentliche Ordnung ist nicht gestört, Krankenhäuser sind nicht überfüllt.

Ein „Erfahrungsbericht“ aus Sicht eines privaten Biotech-Dienstleisters am Beispiel der Schweinegrippe gibt Einblicke in die Anforderungen an und die Effizienz von lokalen, nationalen und internationalen Task-force-Einheiten im Kampf gegen pandemische Bedrohungen. Eine rasche und koordinierte Formierung von qualifizierten Einsatzkräften, die in verantwortungsvoller, engagierter und unaufregter Weise in ihren jeweiligen Spezialgebieten Hand in Hand miteinander kooperieren, ist Voraussetzung für eine wirkungsvolle Sicherung der Gesundheit und Unversehrtheit der Bürger der Bundesrepublik Deutschland und darüber hinaus. Inwieweit Erfahrungen aus der Vergangenheit genutzt wurden und werden, um potentiell dringende Notwendigkeiten zu antizipieren und im Bedarfsfall entsprechend zu reagieren (preparedness?), zeigt sich in Zeiten akuter Bedrohungen, wie am aktuellen Beispiel der Schweinegrippe.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Einsatz der MALDI-TOF-MS bei der Diagnostik von Bakterien und Pilzen

M. Erhard

AnagnosTec Gesellschaft für Analytische Biochemie & Diagnostik mbH
Potsdam/Golm

Die Kombination aus MALDI-TOF-Massenspektrometrie und AnagnosTec-„SARAMIS“ - (Spectral ARchiving And Microbial Identification System), einer Software und Datenbank, stellt ein schnelles Verfahren zur Identifizierung von Bakterien und Pilzen dar. Bei diesem Verfahren werden die Bakterien ohne Aufreinigungsschritte analysiert. Im Ergebnis erhält man ein eindeutiges sog. „fingerprint“-Massenspektrum vom untersuchten Erreger. Dieser „fingerprint“ ist individuell und kann zur Identifizierung von Genus, Species, Subspecies bis hin zum Stamm herangezogen werden.

Bei der Probenvorbereitung werden nur geringste Mengen von Bakterien oder Pilzen benötigt. Typischerweise werden die Zellen nach 24 h Wachstum auf AGAR-Medien analysiert. Es ist jedoch auch möglich, Zellen aus Flüssigkultivierungen nach erfolgter Zentrifugation zu analysieren. Das Zellmaterial der Isolate wird direkt von der AGAR-Platte auf den Probenträger übertragen. Zu der Probe wird anschließend noch die notwendige Matrixlösung pipettiert. Je nach verwendeten Probenplatten können 48, 192 bis zu 384 Proben vorbereitet werden. Die bestückte Probenplatte wird ins Massenspektrometer eingeschleust, und die automatische Messung kann gestartet werden.

Nach der automatischen Messung der Proben werden die Spektren automatisch bearbeitet. Die so erhaltenen charakteristischen Massenspektren werden an die SARAMIS-Software (Spectral ARchiving And Microbial Identification System) übergeben und gegen eine Datenbank ausgewertet. Ein Hauptteil der detektierten Signale repräsentiert Ribosomenproteine. Deren Anwesenheit ist überwiegend wachstumsphasenunabhängig. Als Ergebnis erhält man nach wenigen Minuten die Identifizierung.

Innerhalb des Vortrages werden aktuelle Ergebnisse aus der Routinediagnostik der *Riemerellen*-, *Pasteurella*-, *Helcococcus*- und *Mannheimia*-Erreger gezeigt. Interessant dabei ist der Vergleich zu verwandten Erregern, isoliert aus Wiederkäuern, und die Identifizierung neuer Species.

Die SARAMIS Datenbank enthält zurzeit ca. 40.000 Datensätze, welche als Referenzen zur Identifizierung herangezogen werden können. In Zusammenarbeit mit klinischen Kooperationspartnern, Stammsammlungen, Veterinärinstituten und weiterer Life-Science-Partner erfolgen ein kontinuierlicher Datenaustausch und die Erweiterung der SARAMIS-Referenzdatenbanken.

Das Potential der Methode kann durch folgende Vorteile beschrieben werden: Einsetzbar für alle Bakterien und Pilze; keine Vorauswahl von Medien, Wachstumsstadien, Reagenzien oder Reaktionen; Verwandtschaften zwischen Organismengruppen werden erkannt; Klassifizierung neuer, unbekannter Erreger; Probenvorbereitungszeit kürzer als 60 Sekunden; Möglichkeit zur Analyse von Mischproben; Proben sind nach der Fixierung auf dem Probenträger mehrere Wochen stabil.

Die Präsentation demonstriert das Potential der Methode anhand von Bakterien. Dies beinhaltet neben der einfachen und schnellen Probenvorbereitung die Messung, die Auswertung im SARAMIS-System mittels Superspektren und weiterführenden Clusteranalysen.



Arbeitskreis für veterinärmedizinische
Infektionsdiagnostik (AVID)

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009

DNA-Mikroarrays in der Diagnostik – Stand und Perspektiven

K. Sachse

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für molekulare Pathogenese, Jena

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

DirektPCR – gehört die Nukleinsäureextraktion der Vergangenheit an?

B. Hoffmann, B. Haas und M. Beer

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Virusdiagnostik, Insel Riems

Seit einiger Zeit werden von verschiedenen Firmen die unterschiedlichsten Verfahren und Lösungen zum direkten PCR-Nachweis von Proben angeboten. Hierbei erfolgt die Genomamplifikation ohne dass eine vorherige Nukleinsäure-Extraktion erfolgen muss. Aufgrund der hohen DNA-Genomlast ist dies für qualitative PCR-Anwendungen (z. B. Genotypisierung basierend auf Mäuseschwanz-DNA) ohne Probleme anwendbar. Darüber hinaus hat sich die DirectPCR auch bei Analysen der Genexpression in Zellkultursystemen bewährt. Im Gegensatz dazu wurde die Anwendung entsprechender Verfahren in der veterinärmedizinischen Diagnostik lange kritisch gesehen. Die unterschiedlichen Probenmaterialien sowie deren verschiedenen inhibitorischen Faktoren machen eine sichere und reproduzierbare PCR-Diagnostik eher unwahrscheinlich.

Nichtsdestotrotz hat sich für spezifische Anwendungen im Bereich der Veterinärmedizin die Funktionalität der DirectPCR bestätigt. Hier sind vor allem der Nachweis von BVDV-Genom aus Ohrstanzproben oder Kits zum Nachweis von PRRSV-Genom in EDTA-Blutproben zu nennen. Basierend auf diesen DirectPCR-Verfahren wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt, die die Anwendbarkeit dieser Systeme für die Detektion von alternativen Pathogenen beleuchten. In die Analysen wurden DirectPCR-Lyse-Lösungen der Firmen AnDiaTec, Epicentre, LDL und Qiagen einbezogen. Als Untersuchungsmaterialien wurden Serum und EDTA-Blut von KSP-positiven Schweinen und EDTA-Blut aus BTV-positiven Rindern und Schafen verwendet. Die Resultate der RT-qPCR, basierend auf der DirectPCR, wurden mit den Ergebnissen der unter Standardbedingungen extrahierten RNA verglichen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die unterschiedlichen DirectPCR-Verfahren im Prinzip funktionieren, allerdings untereinander recht unterschiedliche Resultate lieferten. Hierbei zeigte sich, dass die Verfahren von LDL und Qiagen den Ergebnissen mit vorheriger Extraktion am nächsten kamen und am sensitivsten einzustufen sind. Basierend auf den relativ guten Ergebnissen der vergleichenden Untersuchungen werden Einsatzmöglichkeiten diskutiert. Dies können neben der Suche nach hochlastig-infizierten und damit diagnostisch-relevanten Tieren (z. B. BVDV-Virämikern, pCV-2-infizierte Schweine) auch Hochdurchsatz-Screeninguntersuchungen sein. Darüber hinaus ist vorstellbar, dass DirektPCR-Lyse-Systeme die Anwendbarkeit und Praxistauglichkeit von sogenannten „Penside“-Testverfahren zum Nachweis von Pathogenen im Feld erhöhen können.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

IBRgE-Diagnostik aus Tankmilch – möglich?!

C. Schröder, C. Engemann, N. Buerger, S. Kanitz und J. Gabert

Labor Diagnostik GmbH Leipzig

Einleitung

Seit Dezember 2001 gibt es in Deutschland die Untersuchungspflicht für alle zur Zucht vorgesehenen Rinder, die älter als 9 Monate sind. Im Jahr 2008 wurden 3,68 Millionen Blut- und Einzelmilchproben in Deutschland untersucht sowie 281.442 Sammelmilchproben.

85,1 % der deutschen Milchvieh- und Mutterkuhbestände sind BHV-1-frei bzw. BHV-1-gE-antikörperfrei. Unterschiede gibt es in den Bundesländern beim Anteil freier Bestände wie auch beim Einsatz der IBR-Markervakzine. Seit 2001 ist die Anzahl der im Tierseuchennachrichtensystem angezeigten BHV-1-Neuaustritte stetig rückläufig. Diagnostische Probleme bei der BHV-1-Bekämpfung ergeben sich aus dem hohen Untersuchungsaufwand für geimpfte Tiere durch die Testung von Einzelblutproben, weil kein ausreichend sensitiver und spezifischer gE-Antikörpertest für Milchproben verfügbar ist.¹

Obwohl ein zunehmend großer Teil der Marker-geimpften Rinder gE-antikörperfrei ist, können solche Bestände nicht auf die kostengünstige Tankmilchuntersuchung umgestellt werden.

In den Niederlanden wurde die Wahrscheinlichkeit ein IBR-positives Tier in Tankmilchproben nachzuweisen in Beständen von 45 Tieren nur mit 10 – 25 % ermittelt². Dort wird versucht, die geringe Sensitivität des IBRgE-Tests durch ein hohes Untersuchungsintervall von monatlichen Tankmilchuntersuchungen auszugleichen³.

In Deutschland wurden in der Vergangenheit häufig Milchaufkonzentrierungen durchgeführt, um die Sensitivität bei Tankmilchuntersuchungen zu erhöhen⁴. Das Ammoniumsulfat-Konzentrierungsverfahren war allerdings aufwendig und schlecht standardisierbar. Erfolgversprechende Ansätze, über eine verbesserte Probenvorbereitung eine Untersuchung von Tankmilchproben im IBRgE-ELISA zu ermöglichen, hat es gegeben⁵, die aber nicht sehr praktikabel waren.

Die Labor Diagnostik Leipzig hat mit dem CATTLETYPE Milk Prep Kit ein deutlich verbessertes Verfahren zur Aufkonzentrierung von Antikörpern aus Tankmilchproben entwickelt. Stark und mittelstark gE-Antikörper-positive Milchproben werden hiermit sicher im Pool mit 49 negativen Milchproben erkannt⁶.

Material und Methoden

Untersucht wurde ein Landwirtschaftsbetrieb mit über 900 Milchkühen. Der Betrieb stockt seinen Rinderbestand kontinuierlich durch Zukäufe aus Deutschland und den Niederlanden auf. Trotz jahrelanger IBR-Markeringung ist der Betrieb gE-positiv, und es kommt immer wieder zu Neuinfektionen.

Im Juli 2009 wurden 84 im Rahmen der Milchleistungsprüfung von vorberichtlich gE-positiven Tieren genommene Einzelmilchproben im IBRgE-ELISA (IDEXX GmbH, Ludwigsburg) getestet. Anschließend wurden diese Einzelmilchen in Pools aus 49 negativen Milchen verdünnt, mit dem CATTLETYPE Milk Prep Kit aufkonzentriert und wieder im IBRgE-ELISA getestet. Schwach gE-positive Einzelmilchen wurden zusätzlich auch im Pool mit 24 negativen Milchen getestet. Blutserologische gE-Ergebnisse aus dem Zeitraum Januar bis August 2009 lagen vor und wurden den Ergebnissen der Einzelmilchen sowie denen der aufbereiteten Tankmilchen gegenübergestellt.

Ergebnisse

Milchproben von blutserologisch deutlich positiven Tieren waren zumeist auch in der Einzelmilch positiv. 73 % (61 von 84) der positiven Milchproben konnten im 50er Pool nachgewiesen werden. 23 im 50er Pool negativ getestete Milchproben zeigten häufig bereits im Blut und in der Einzelmilch nur schwache Signale. Diese Einzelmilchen wurden noch einmal als 25er Pool getestet. Dabei konnten 20 der 23 zuvor negativen Proben detektiert werden.

Nach Vorbereitung der Poolmilchproben mit dem CATTLETYPE Milk Prep Kit konnten 73 % der positiven Milchen im 50er Pool und 96 % im 25er Pool nachgewiesen werden. Alle bisher getesteten gE-negativen Milchpools wurden auch nach Aufkonzentrierung negativ getestet.

Schlussfolgerung

Das hier vorgestellte Verfahren ermöglicht eine deutliche Sensitivitätssteigerung bei der Untersuchung von Tankmilchen auf IBRgE-Antikörper.

Viele Tierseuchenparameter werden bereits über die Tankmilch untersucht. Durch die Möglichkeit des Nachweises von BVDV aus Ohrstanzenproben entfällt auch bei der BVDV-Bekämpfung weitgehend die Notwendigkeit der aufwendigen Blutentnahme, die bisher oft für die kombinierte BHV1- und BVDV-Diagnostik erfolgte.

Mit dem CATTLETYPE Milk Prep Kit ist eine kostengünstige Überwachung gE-negativer Impfbestände über die Tankmilch möglich. Eine Reinfektion mit wenigstens einem deutlich gE-positiven Tier kann im 50er Milchpool nachgewiesen werden. Bei diesem im Vergleich zum bisherigen deutlich günstigerem Verfahren könnte die Zuverlässigkeit durch eine halbjährige Tankmilchuntersuchung weiter verbessert werden. In einem Bundesland läuft hierzu bereits ein Feldversuch zur Zuverlässigkeit und Praktikabilität der Methode im Rahmen der IBR-Sanierung.

Literatur

1. Höreth-Böntgen, D., Teuffert, J., König, P., Beer, M. (2008) Bovine Herpesvirus Typ1-Infektion (alle Formen) – Infectious bovine rhinotracheitis, Tiergesundheits-Jahresbericht 2008, www.fli.bund.de/1167.html
2. K. Frankena, G. J. Koskamp, P. Franken, J. Vandehoek, and J. A. Kramps (1997), Probability of detecting antibodies to bovine herpesvirus 1 in bulk milk after the introduction of a positive animal on to a negative farm The Veterinary Record, Vol 140, Issue 4, 90-92
3. Mars J. (2009) pers. Mittlg.
4. Forschner, E., Bünger, I. (1986) Nachweis von IBR/IPV, Leukose-, und Brucelloseantikörpern in Bestandsmilchproben mit ELISA nach einer einfachen Konzentrierungsmethode. Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 93, 112-115, 1986.
5. Euler M., Schlatterer B (2000) BHV1-Diagnostik in Bestandsmilch – eine Frage der Probenaufreinigung, Poster, on File
6. Engemann C., Kanitz S., Schroeder C., Gaunitz C., J. Gabert (2009) Neue Möglichkeiten in der IBR-Diagnostik – effiziente Alternativen? 7. Stendaler Symposium zur BHV-1, BVD, Paratuberkulose und Blauzungenkrankheit des Landesamtes für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 11. – 13. März

**4. Riemser Diagnostiktag
5./6. November 2009**

**Anwendbarkeit imperfekter diagnostischer Tests mit cut-off's
in Abhängigkeit von epidemiologischen Anforderungen und Gegebenheiten**

A. Fröhlich

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für Epidemiologie, Wusterhausen

In praxisbezogenen Wissenschaften ist man häufig darauf angewiesen, aus mehr oder weniger fehlerbehafteten Messungen Aussagen abzuleiten. Für die Formulierung epidemiologischer Aussagen ist aus verschiedensten Gründen hierüber hinaus nicht immer eine Messung an allen Objekten einer Menge möglich, über die die Aussage gelten soll. In diesem Umfeld bilden diagnostische Testresultate hinsichtlich einer Krankheit von Stichproben aus einer fest umrissenen Population eine wesentliche Komponente der Messung. Zur Gewährleistung angestrebter Aussagen mit einer zuvor festgelegten Genauigkeit ergeben sich minimale Anforderungen an die Güteeigenschaften des hierfür verwendeten diagnostischen Tests.

Es wird gezeigt, dass sich für imperfekte diagnostische Tests, die mit einem „cut-off“-Wert arbeiten, in der Epidemiologie in der Regel ein breiteres Spektrum ihrer Anwendbarkeit als bislang vermutet erschließen lässt, sofern auf variable „cut-off“-Werte und der hieraus resultierenden Güteeigenschaften eines diagnostischen Tests zurückgegriffen werden kann.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Derzeitige Erkenntnisse zum BVD-Nachweis aus Ohrstanzen im Rahmen einer Studie am LGL

J. Drdlicek, A. Kupča, J. Christian und K. H. Bogner

Landesinstitut Tiergesundheit und Futtermittel,
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen

Im Hinblick auf die ab 2011 gültige BVD-Bundesverordnung lässt das Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit seit 2008 am LGL eine Studie zur Eignung der Ohrstanzmethode bei neugeborenen Kälbern zur Bekämpfung der BVD/MD (Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease) durchführen. Der Vortrag bietet eine Übersicht über die angewandten Ohrmarkensysteme und Untersuchungsmethoden und stellt die bisherigen Erkenntnisse zur Diskussion.

An der Studie ist das Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit an den Standorten Erlangen und Oberschleißheim beteiligt. Während in Oberschleißheim 68 ausgewählte Betriebe aus ganz Bayern an der Studie teilnehmen und die Untersuchungen mit Caisley-Ohrstanzen durchgeführt werden, werden in Erlangen Allflex-Ohrstanzen untersucht, die aus 367 zufällig ausgewählten mittelfränkischen Betrieben stammen.

Die verwendeten Ohrmarkensysteme weisen deutliche Unterschiede in Bezug auf die Probenkonservierung, die Gefäßbeschaffenheit und die Bearbeitung im Labor auf. Eine Weiterentwicklung der Systeme ist bei beiden Herstellern notwendig und zu erwarten. Je nach Ohrmarkensystem müssen noch Öffnungsverfahren, Sicherheit der Probennahme oder Automatisierbarkeit verbessert werden.

Am Standort Erlangen werden jeweils zwei Allflex-Ohrstanzproben eines Tieres parallel in der Real-Time-RT-PCR untersucht.

- Als Standardmethode wird die Real-Time-RT-PCR nach Hoffmann et al. (2006) in leicht modifizierter Form verwendet. Die Proben werden in RLT-Puffer mit Proteinase-K-Zusatz einzeln lysiert, gepoolt und anschließend inkubiert. Nachfolgend wird die RNA über Säulen aufgereinigt (RNeasy Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden).
- Die Zweitproben werden mit dem automatisierten Verfahren der Fa. AnDiaTec (Kornwestheim) untersucht (BoVir-SL® BVDV TaqMan RT-PCR Kit). Nach dem Ausstanzen werden die Proben lediglich einer Schnelllyse unterzogen, gepoolt und anschließend direkt in die PCR eingesetzt.

Insgesamt wurden bisher Ohrgewebeproben von über 18.000 Tieren vergleichend untersucht, von denen 161 ein positives Ergebnis zeigten. In der Nachuntersuchung konnten 99 dieser Tiere als persistent infiziert (PI-Tiere) bestätigt werden.

62 Tiere brachten dagegen in der Nachuntersuchung ein negatives Ergebnis und sind demnach nicht persistent infiziert gewesen (NPI). Es fällt auf, dass die Methode mit vorhergehender Aufreinigung all diese Tiere (PI und NPI) in der Erstuntersuchung positiv getestet hat, wohingegen die Methode ohne vorhergehende Aufreinigung zwar alle PI-Tiere erkannte, aber nur bei 12 der NPI-Tiere ein positives Ergebnis brachte.

Aktuell ist die Nachuntersuchung positiver Reagenten in Bayern Pflicht, wobei die in der amtlichen Methodensammlung festgelegten Abstände zwischen Erst- und Bestätigungsuntersuchung einzuhalten sind. Dies hat zur Folge, dass potentielle PI-Tiere, die massiv Virus ausscheiden, weiterhin eine Infektionsquelle für den eigenen sowie für andere Bestände darstellen. Die Möglichkeit einer direkten Merzung aller positiven Reagenten oder die Festlegung eines Grenzwertes für eine Unterscheidung zwischen nochmals zu untersuchenden und direkt zu merzenden Tieren wird in Abhängigkeit der verwendeten Methodik diskutiert.

Literatur:

Hoffmann, B., Depner, K., Schirrneier, H., Beer, M. (2006):

A universal heterologous internal control system for duplex real time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses.

J Virol Methods, 136, 200-209

**4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009**

**Automatisierungslösungen und Datenmanagement bei Rinderblut- und
Ohrstanzproben mit Hilfe der HIT-Datenbank**

M. Saßerath

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper (CVUA-RRW)
Anstalt öffentlichen Rechts, Krefeld

Für Untersuchungseinrichtungen im Bereich der staatlichen Bekämpfung von Tierkrankheiten steigen insbesondere im Bereich der Rinder-Massendiagnostik die Anforderungen - neben dem rein fachlichen Gesichtspunkt - weil

- 1) mit vorhandenen Ressourcen häufig sehr flexibel auf zusätzliche Aufgaben (Seuchenausbrüche, zeitlich befristete Sanierungsprojekte) effizient und effektiv reagiert werden muss,
- 2) eingesandte Rinderproben zunehmend sehr individuell und selektiv untersucht werden müssen,
- 3) die automatisierte Dokumentation von Untersuchungsergebnissen einen immer höheren Stellenwert bekommt (lückenloser Gesundheitsstatus des Einzeltieres, Überwachung des Sanierungsfortschritts, erleichterte Bearbeitung durch Veterinärämter etc.),
- 4) die Forderung der Politik nach Einsparpotential bei öffentlichen Aufgaben an Bedeutung gewinnt und
- 5) die wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit bei höchst möglicher fachlicher Kompetenz im Vergleich mit privaten Untersuchungseinrichtungen weiterentwickelt werden muss.

Seit 2005 arbeiten die vier Untersuchungseinrichtungen in NRW in Zusammenarbeit mit der betreuenden LIMS-Firma und der HIT-Datenbank in München verstärkt an Lösungsansätzen, um die (Daten-) Abläufe rund um die Probennahme bei bestimmten Sanierungsprogrammen möglichst zu vereinfachen und zu automatisieren.

Im Stall sollen bei der Blutprobennahme dem Landwirt bzw. Tierarzt alle zur Selektion der untersuchungspflichtigen Tiere notwendigen Informationen in einfacher Form zur Verfügung stehen und die zu einem Untersuchungsauftrag für das Labor notwendigen Daten maschinenlesbar erfasst werden können.

Die Möglichkeit, die Anträge im Labor mit allen Daten automatisch weiter zu verarbeiten ermöglichte erstmals das angestrebte Ziel, eine papierlose Befundmitteilung an die Kunden (Tierärzte, Veterinärämter, Landwirte, Zuchtorganisationen etc.) und automatische Ergebnisdokumentation für die quantitativ bedeutendsten Rinderkrankheiten in HIT zu etablieren.

Im Vortrag werden die wesentlichen Bedingungen, Aspekte und Entwicklungsschritte bei Blut- und Ohrgewebeuntersuchungen dargestellt, die den aktuellen Stand in NRW ermöglicht haben.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Automatisiertes Sample Management in Veterinäruntersuchungsstellen

T. Bamme¹ und M. Frey²

¹Hamilton Robotics GmbH, DE-München, ²Hamilton Bonaduz AG, CH-Bonaduz

Das Lagern und Verwalten von Proben ist bereits in humanmedizinischen Labors eine große Herausforderung. Im Bereich der Veterinärmedizin wird die Komplexität des Probenmanagements dadurch potenziert, dass es sich nicht nur um unterschiedliche Proben wie Blut oder Gewebe handelt, sondern zudem eine ungeheure Vielfalt von Spezies betrachtet wird. Mit dieser Vielfalt steigen auch die Anforderungen an die organisierte Probenlagerung und das Probentracking, welches manuell nur mit erheblichem Zeit- und Personalaufwand sowie größter Sorgfalt bewältigt werden kann.

Durch Automatisierung kann die Prozesssicherheit im Bereich der Probenlagerung und -verwaltung gravierend gesteigert und darüber hinaus eine hohe Qualität der Proben auch über längere Zeit garantiert werden. So sind das Sample Tracking und die Sicherung der Probenstabilität die treibenden Beweggründe für das Einführen automatisierter Probenspeicherung.

Steigerung der Prozesssicherheit und Sample Tracking:

Die Einhaltung formalisierter Prozesse für das Einführen und Entnehmen von Proben werden durch Automatisierung garantiert. Multiple Registrierung der Proben an Hand von Barcodes bei der Einfuhr, bei einem optionalen Re-Audit sowie beim Ausführen in Verbindung mit einer Datenbank ermöglichen stets eine eindeutige Identifikation des Lagerortes jeder Probe und somit deren Auffinden ohne Suchen.

Steigerung der Probenqualität bei tiefen Temperaturen durch automatisiertes Sample Management:

Durch wiederholtes Öffnen von Zugangstüren und Suchen der gewünschten Probe bei geöffneter Tür wird zum einen warme Luft und zum anderen Feuchtigkeit in das Tiefkühlfach eingebracht. Dies führt zu einem zu Temperaturschwankungen der gespeicherten Proben und somit zu einer schleichenden Degenerierung des gelagerten Materials. Zum anderen legt sich die eindringende Luftfeuchtigkeit auf dem Probenmaterial ab.



Bei manueller Tiefkühlagerung:

- Mit zunehmender Frostbildung dauert die Suche nach den Proben länger.
- Mehr Zeit für die Probensuche bedeutet, dass die Tür des Gefrierfachs länger offen bleibt.
- Dies wiederum verursacht größere Temperaturschwankungen und somit eine beschleunigte Degenerierung der Proben.
- Außerdem gelangt noch mehr Frost zu den Proben.



Dieses Mehr an Feuchtigkeit bedeutet mehr Frost, bei mehr Frost dauert die Suche nach den Proben länger, was wiederum dazu führt, dass die Zugangstüren länger offen bleiben und dadurch noch mehr Feuchtigkeit in das Fach gelangt. Roboter hingegen können auch bei niedrigsten Temperaturen arbeiten und daher die gewünschten Proben zusammenstellen, ehe sie durch ein kleines, kurzzeitig geöffnetes Portal übergeben werden.

Ein Beispiel für ein System zur automatisierten Probenlagerung ist der Sample Access Manager für Temperaturen von -80 °C bis +20 °C. Eine interne Robotik verstaut die zu lagernden Proben in den dafür vorgesehenen Regalfächern. 1D- und 2D-Barcode-Leser registrieren jede ein- und ausgehende Probe. Ein Zugangsportal mit reduzierter und kontrollierter Luftfeuchte und individuelle Probenzusammenstellung bei -20 °C garantieren geringsten Feuchtigkeitseintrag und minimale Probenbeanspruchung bei der Reformatierung von Proben.

Dieses System kann auch in einen gesamten Workflow integriert werden, sodass die Diagnostikverfahren komplett automatisiert ablaufen können.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Diagnostik jenseits des Infektionsnachweises am Beispiel von PI-3-Virus

F. Wiescher, B. Janowitz, M. Alex und J. Böttcher

Zentralinstitut des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V.

Das bovine Parainfluenzavirus Typ 3 (PI-3-Virus) ist neben anderen Viren am „Bovine Respiratory Disease Complex“ (BRDC) beteiligt. Verschiedene Impfungen werden eingesetzt, um diese weit verbreitete, virale Infektion zu kontrollieren. Es war das Ziel dieser Arbeit, Methoden zur Qualitätskontrolle der Impfung zu etablieren.

Es wurden ein Serumneutralisationstest (SNT) und ein Interferon- γ -ELISA eingesetzt, um Komponenten der humoralen und zellulären Immunität gegenüber PI-3-Virus zu analysieren. Für die Messung von IFN- γ wurde ein kommerzieller ELISA (Bovigam[®], Prionics, Zürich) herangezogen. Zur Stimulation der T_H1-Lymphozyten in 300 μ l heparinisiertem Vollblut wurde statt des *Mycobacterium bovis*-PPD hitzeinaktiviertes PI-3-Virusantigen (20 μ l; $>10^7$ KID₅₀/ml) eingesetzt. Pokeweed mitogen (5 μ g/ml Blut) und Medium von nicht infizierten Zellkulturen dienten als Kontrolle. Die Stimulation wurde im Doppelansatz in Mikrotiterplatten durchgeführt. Für den SNT wurden Serumproben hitzeinaktiviert; Verdünnungen (1/5 bis 1/320) wurden mit PI-3 Virus inkubiert (1h, 37 °C), anschließend wurde das Virus-/Serumgemisch auf KOP-Zellen transferiert und über 6 Tage bebrütet. Es wurden 100 KID₅₀ des Virus eingesetzt, die Untersuchung erfolgte im Doppelansatz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 48 Tiere aus zwei Herden, im Alter zwischen zwei Wochen und mehr als fünf Jahren, getestet. Neutralisierende Antikörper gegen PI-3-Virus wurden sowohl in Tieren bis zum Alter von 5 Monaten, als auch in Tieren, die älter als 9 Monate waren, gefunden. Die Lymphozyten der Kälber bis zum Alter von 6 Monaten reagierten nach Stimulation durch PI-3 nicht mit Sekretion von IFN- γ , wohingegen fast alle Tiere, die 7 Monate alt oder älter waren, starke Reaktionen zeigten.

Niedrige Neutralisationstiter bei Kälbern unter 5 Monaten wurden als maternale Antikörper betrachtet. Zwischen 6 und 8 Monaten dominierten IFN- γ -Reaktionen das Bild, ohne dass neutralisierende Antikörper vorhanden waren: Dies deutet auf eine Phase aktiver Infektionen hin. Im Anschluss wurden sowohl neutralisierende Antikörper als auch IFN- γ -Reaktionen gemessen.

Danksagung

Diese Studie wurde durch den Freistaat Bayern und die Bayerische Tierseuchenkasse gefördert. Die Autoren bedanken sich bei Dr. Hermühlheim für die Organisation und Entnahme der Blutproben.

4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009

**Simultaner Nachweis von Infektionserregern beim Rind
mit der Multiplex-Real-Time-PCR**

W. Gaede

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt,
Fachbereich Veterinärmedizin, Stendal

Vertreter der Familie *Chlamydiaceae* sowie *Coxiella burnetii* und *Neospora caninum* zählen in Deutschland zu den häufigsten infektiösen Abortursachen bei Wiederkäuern. Für den sensitiven direkten Erregernachweis im Rahmen der Abortdiagnostik hat sich die PCR etabliert. In ersten Untersuchungen sollte daher der simultane Nachweis dieser Erreger mittels Multiplex-Real-Time-PCR unter Nutzung gut dokumentierter Literaturprotokolle validiert werden. Im Einzelnen wurden ausgewählt:

- *Chlamydiaceae*: FLI-Protokoll, s. auch Ehrlich et al. (2006)
- *Coxiella burnetii*: Klee et al. (2006)
- *Neospora caninum*: Großmann, pers. Mitteilung 2005, s. auch Sörgel et al. (2009).

Als interne Kontrolle wurde der β -Actin-Nachweis (Toussaint et al., 2007, mod. von Hoffmann, 2008) integriert. Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem Quantitect-Multiplex-PCR-Kit von Qiagen durchgeführt.

Für die Ermittlung der analytischen Sensitivität wurden zunächst von der Firma GeneExpress in Auftragssynthese hergestellte Plasmide titriert. Dabei wurden reproduzierbare Nachweisgrenzen von 0,5 Kopien je PCR-Reaktion bzw. 100 Kopien pro ml Template ermittelt. Anhand von schwach-positiven Feldproben wurde die gleichwertige Sensitivität im Vergleich zu den bisherigen im Labor verwendeten Prüfverfahren festgestellt. Die diagnostische Sensitivität (Inklusivität der verschiedenen Spezies, Subtypen etc.) wurde im Wesentlichen als durch die Publikationen gesichert angesehen.

Bei der Prüfung der analytischen Spezifität (Exklusivität) wurde gegen tierartspezifische Matrizes sowie wesentliche differentialdiagnostisch relevante Erreger keine Kreuzreaktionen festgestellt.

Auch bei der Re-Analyse alter Templates wurden vorherige positive Ergebnisse bestätigt. Allerdings sollten bei Einzelproben auftretende Ct-Werte über 35 wie auch bei anderen Protokollen zur Real-Time-PCR durch eine Wiederholung auf Reproduzierbarkeit geprüft und bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der simultane Nachweis von *Chlamydiaceae*, *Coxiella burnetii* und *Neospora caninum* mittels Real-Time-Multiplex-PCR zum Einsatz für die Diagnostik von Reproduktionsstörungen bei Rindern und anderen Wiederkäuern geeignet ist und sowohl die Zeit als auch die Kosten für den Nachweis dieser Erreger senken kann. Auch der Chlamydiennachweis in nicht von Wiederkäuern stammenden Proben kann mit diesem Verfahren abgearbeitet werden.

Um analog die Abklärung von Pneumonieursachen zu beschleunigen, sollten die Nachweise von BHV-1 (gD), *Mycoplasma bovis* und ebenfalls Chlamydien zusammengefasst werden.

Neben dem o. g. Chlamydienprotokoll werden dazu die ebenfalls vom FLI stammenden Real-Time-Protokolle geprüft. Dabei hatte sich ein höherer Optimierungsbedarf ergeben. Die Untersuchungen zum Sensitivitätsvergleich mit den Standardverfahren anhand von Laborstandards und anhand von positiven Feldproben sind gegenwärtig noch nicht abgeschlossen.

**4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009**

**Bone marrow aplasia with haemorrhagic disease in calves in Germany:
Investigations on its aetiology**

M. Y. Halami², E. C. Kappe¹, B. Schade¹, M. Alex¹, D. Hoffmann¹, A. Gangl¹, K. Meyer³, W. Dekant⁴, B.-A. Schwarz⁵, R. Johne⁶, J. Buitkamp⁷, J. Boettcher¹, H. Müller²

¹Bavarian Animal Health Service, Poing, Germany; ²Institute for Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany; ³Center of Life and Food Sciences, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany;

⁴Department of Toxicology, University of Würzburg, Würzburg, Germany;

⁵Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Leipzig, Germany; ⁶Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany; ⁷Bavarian State Research Center for Agriculture, Poing, Germany

A new fatal haemorrhagic diathesis in calves observed in dairy cattle farms since 2007 was designated as haemorrhagic disease syndrome (HDS). Only single or a few animals per herd were affected. Calves fell ill within the first month of life, independent of breed or sex. There was no indication of hereditary disease.

Meanwhile more than 200 calves have been investigated. Pathological examination allowed the definition of gross and histopathological lesions and to give some insight into the aetiology. Haemorrhages, particularly in skin, subcutis and gastrointestinal tract were major findings in all animals. Severe hypoplasia or even aplasia of the bone marrow was generally observed, lymphocytic depletion and inflammatory lesions were less frequent. Blood analysis indicated an aplastic pancytopenia. The resulting thrombocytopenia is considered to be a major pathomechanism of HDS

Tests for specific toxins remained negative as well as tests for bacterial infections considered to be aetiologically relevant, bovine viral diarrhoea virus and bluetongue virus. A nested broad-spectrum PCR allowed detection of circoviral DNA in 5 out of 25 HDS cases and in 1 out of 8 non-HDS cases submitted to necropsy. Sequencing of the whole viral genome revealed high similarity (up to 99 %) with porcine circovirus type 2b (PCV2b). In immunohistochemistry single bone marrow cells stained weakly positive for PCV2 antigen in 1 of 8 animals tested.

This is the first report on circovirus infections in cattle in Germany. HDS shares similarities with a circoviral infection in chickens (chicken infectious anaemia). The exact cause of HDS still remains unknown. A multifactorial aetiology involving infection, immunopathology, toxæmia is conceivable.

The authors wish thank the Freestate of Bavaria and the Bavarian Joint Founding Scheme for the Control and Eradication of Contagious Livestock Disease.

Keywords: calf, bone marrow depletion, haemorrhage, thrombocytopenia, circovirus

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Schweinepest – Aktuelle Situation in Deutschland und Europa

C. Staubach¹ und S. Blome²

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

¹Institut für Epidemiologie, Wusterhausen

²Institut für Virusdiagnostik, Insel Riems

Die Klassische Schweinepest (KSP) wurde trotz intensiver Bekämpfungsmaßnahmen in Deutschland sowie mehreren Ländern Europas im Haus- und Wildschwein beobachtet.

Mit Ausnahme des Zeitraumes vom 3. März bis 30. Juni 2006, in dem sich 8 Schweinepestausbürche in Nordrhein-Westfalen ereigneten, gelang es seit Februar 2003 bis gegenwärtig, die Hausschweinpopulation Deutschlands frei von dieser Tierseuche zu halten. Erreicht wurde die Stabilisierung der Tierseuchensituation bei Schweinen durch die Einleitung vielfältiger Maßnahmen, wie beispielsweise Schulung und Aufklärung der Schweinehalter sowie der im Kontakt mit Hausschweinen und deren Produkten stehenden Personen einschließlich der Jägerschaft hinsichtlich Wesen, Verlauf und Früherkennung der Krankheit. Im Jahr 2008 wurde zum ersten Mal seit Beginn der 90er Jahre kein Wildschweinepestfall registriert. Die orale Immunisierung wurde in den linksrheinischen Teilgebieten Nordrhein-Westfalens und Rheinland-Pfalz fortgesetzt. Am 8. Januar 2009 wurde jedoch KSP-Virus von einem Frischling rechtsrheinisch isoliert. Das Tier wurde im Rheinisch-Bergischen Kreis, östlich von Rösrath erlegt. Bis heute wurden 23 Fälle von Schweinepest in Nordrhein-Westfalen östlich des Rheins und 14 Fälle im Westerwald im nördlichen Rheinland-Pfalz festgestellt. Seit Ende Februar 2009 werden die Bekämpfungsmaßnahmen durch orale Immunisierung und Intensiv-Monitoringgebiete mit Gesamtbeprobung der Jagdstrecke auch rechtsrheinisch unterstützt. Im März 2009 wurde nach 5 Jahren zum ersten Mal wieder KSP bei Wildschweinen in der südlichen Pfalz im Kreis Primasens festgestellt. In diesem unabhängigen Cluster wurden bis Ende April 8 Wildschweine positiv diagnostiziert. Eine Erweiterung des beimpften Schutzstreifens zu Frankreich um das betroffene Gebiet wurde Ende März vorgenommen.

Nachdem die KSP bei Hausschweinen 2008 in Bulgarien und der Slowakei auftraten, wurde die Erkrankung bis heute nur in einem Hausschweinebestand der Europäischen Union (EU) im Juli 2009 in Litauen festgestellt. Dagegen wurde in den Jahren 2008 und 2009 mehrere Fälle der KSP beim Wildschwein neben Deutschland auch in der Slowakei und Ungarn diagnostiziert. In den Ländern des Balkans wurden Ausbrüche von KSP vor allem in Hinterhofhaltungen sowie vereinzelt bei Wildschweinen beobachtet.

Ausbrüche der Afrikanischen Schweinepest (ASP) in der Europäischen Union wurden zuletzt im Mai 2009, wie auch in den vorangegangenen Jahren, von Italien auf Sardinien gemeldet. Außerhalb der EU breitete sich die ASP seit 2007 über den ganzen Kaukasus aus und wurde im Oktober 2009 im westlichen Teil Russlands bei Leningrad in einer Hinterhofhaltung entdeckt.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Diagnostik und molekulare Epidemiologie im Kontext der aktuellen KSP-Situation

S. Blome¹, G. Strebelow¹, I. Leifer¹, B. Hoffmann¹, Ch. Staubach²
und M. Beer¹

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

¹Institut für Virusdiagnostik, Insel Riems

²Institut für Epidemiologie, Wusterhausen

Diagnostik

Im Rahmen der Ausbruchsgeschehen 2009 wurden vorrangig Organ- und Blutproben mit positivem PCR-Vorbericht aus den Landesuntersuchungsämtern untersucht. Bisher wurden insgesamt 78 KSPV-PCR-positive Wildschweinproben am FLI bestätigt. Mit Beginn der Impfkampagnen erfolgte vermehrt auch ein Nachweis des Impfvirus (insgesamt in 22 Proben). Darüber hinaus wurden Antikörperfunde mittels differenzierender Neutralisationstests abgeklärt bzw. bestätigt.

Für die schnelle Unterscheidung zwischen KSPV-Feldstämmen und Impfvirus wurde eine C-Stamm-spezifische Real-Time-RT-PCR entwickelt und validiert (Leifer et al., 2009)¹. Die Differenzierung basierte auf zwei Nukleotidunterschieden in der Primerbindungsregion im Bereich der E^{ms}-kodierenden Genomabschitte. Die PCR wurde in die Routinediagnostik eingebunden und erbrachte zunächst sehr gute Übereinstimmungen mit der nachfolgenden Sequenzierung. Im Laufe der intensiven Nutzung an diagnostischen Proben traten jedoch Fälle auf, in denen es zu Diskrepanzen zwischen PCR und Sequenzierung kam. Bei der folgenden Analyse konnte gezeigt werden, dass Sequenzunterschiede im Impfstoff bzw. in der Probe zu diesem Problem führten. Um das Problem zu beheben, wurde das System entsprechend angepasst. Das neue System befindet sich in der Validierung und wird zukünftig in der Routinediagnostik eingesetzt. Die Änderung wird allerdings dazu führen, dass der Test nicht mehr C-Stamm-spezifisch sondern genotypspezifisch (1.1) ist.

Molekulare Epidemiologie

Das erste KSPV-Isolat aus dem Januar 2009 zeigte geringfügige aber eindeutige Unterschiede zu Virusstämmen des Genotyps 2.3, die bis 2007 in der Region Euskirchen (NRW, rechtsrheinisch) gefunden wurden. Weder in der nationalen noch in der Sequenzdatenbank am EU-Referenzlabor in Hannover konnten identische Isolate gefunden werden. Aus diesem Grund wurde zu diesem Zeitpunkt ein Neueintrag der KSP nicht ausgeschlossen. Im weiteren Verlauf des Seuchengeschehens wurden Wildschweine gefunden, die einen geringfügig anderen Virustyp trugen. Die Genotypisierung ergab, dass diese Isolate zu 100 % mit früheren Stämmen aus der Region Euskirchen identisch waren. Die nachfolgenden Untersuchungen schlossen die Analyse des Gesamtgenoms dieser Stämme mit ein.

¹ Leifer I, Depner K, Blome S, Le Potier MF, Le Dimna M, Beer M, Hoffmann B, 2009. Differentiation of C-strain "Riems" or CP7_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR. J Virol Methods. 2009 Jun;158(1-2):114-22.

Es zeigte sich, dass sie sehr nahe miteinander verwandt sind und charakteristische Gemeinsamkeiten aufweisen. Insbesondere fanden sich Sequenzmuster, die sich von anderen verwandten Virustypen unterschieden. Somit existieren Hinweise, dass die Stämme einen gemeinsamen Vorfahren haben und als Quasispezies anzusprechen sind. Es ist nach wie vor unklar, wann und wie es dazu kam, dass das Virus den Rhein überquerte. Die Untersuchungsdichte in der Region Euskirchen war zum fraglichen Zeitpunkt sehr hoch, sodass es nicht sehr wahrscheinlich ist, dass eine bedeutende Virusprävalenz in dieser Region unentdeckt blieb. Rechtsrheinisch wurden ebenfalls Untersuchungen durchgeführt, allerdings in sehr viel geringerer Zahl.

Das zweite Ausbruchsgeschehen in der Region um Pirmasens wurde durch einen KSPV-Stamm verursacht, der zu 100 % mit früheren Isolaten aus der Region identisch war (Genotyp 2.3 Uelzen/Bas Rhin). Bisher ist unklar, ob das Virus latent in der Region persistierte oder aus den umliegenden Gegenden wieder eingeschleppt wurde.

Biologische Charakterisierung

Im Rahmen von zwei Tierexperimenten wurde das in Rösrath (NRW) isolierte Virus biologisch charakterisiert. Das Virus zeigte bezüglich Inkubationszeit und Klinik alle Charakteristika eines moderat virulenten Virusstammes. Neben vorwiegend unspezifischen Symptomen und schweren Sekundärinfektionen des Gastrointestinaltraktes traten regelmäßig auch typische Anzeichen wie Hautblutungen und zentralnervöse Symptome auf. Bei der Infektion von jungen Läufer Schweinen betrug die Mortalität 60 %, bei Wildschweinen gleichen Alters 80 %. Ältere Schweine zeigten über lange Zeit unspezifische Symptome (bis zu 20 Tage) bis sie entweder gesundeten oder mit deutlichen Symptomen verstarben. Alle überlebenden Schweine entwickelten neutralisierende Antikörper und schieden kein Virus mehr aus. Zur Zeit erfolgt die weitere Auswertung dieser Versuche.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

HerdChek CSFV Ag Serum: Ein KSPV-Antigen-ELISA mit hoher Sensitivität

S. Blome¹, S. Schmeiser², K. Rammelt³, C. Egli³, A. Schaller³, A. Ballagi³ und C. Schelp³

¹Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für Virusdiagnostik, Insel Riems, Deutschland

²Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Bünteweg 17, Hannover,
Deutschland

³IDEXX Switzerland AG, Liebefeld, Schweiz

Im Frühjahr 2008 entschied das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Antigen-ELISA zum Nachweis von Infektionen mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV, engl. CSFV) nicht mehr für die Diagnostik in Deutschland freizugeben. Diese Entscheidung betraf alle in Deutschland auf dem Markt befindlichen KSPV-Antigen-ELISA und sie stützte sich auf zwei Erkenntnisse:

1. Mit der „Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction“ (Real-Time-RT-PCR) stand eine Technik für den Erregernachweis zur Verfügung, die eine deutlich höhere Sensitivität aufwies als die damaligen ELISA-Systeme.
2. Am Beispiel des HerdChek BVDV Ag Serum Plus ELISA war ersichtlich, dass die Sensitivität der KSPV-Antigen-ELISA gesteigert werden konnte.

Trotz der höheren analytischen Sensitivität der PCR hat der Antigen-ELISA einen Platz in der KSP-Diagnostik. Ein ELISA ist:

- einfach in der Durchführung
- robust gegenüber schwierigen Probenmatrizes
- kostengünstig
- automatisierbar
- schnell auf hohen Probendurchsatz umstellbar

Diese Faktoren kommen insbesondere bei einem KSP-Ausbruch zum Tragen, wenn innerhalb kürzester Zeit grosse Probenmengen abgearbeitet werden müssen.

Basierend auf dem schon seit etwa 15 Jahren bewährten Nachweis von viralem E^{rns} im Serum und Plasma und der Verwendung der im HerdChek BVDV Ag Serum Plus ELISA benutzten Reagenziensysteme wurde ein neuer ELISA für die Detektion von KSPV-Antigen etabliert. Dieser Test erkennt zuverlässig E^{rns} von Pestiviren im Serum/Plasma von Schweinen. Positive ELISA-Ergebnisse müssen im Referenzlabor als KSPV-spezifisch bestätigt werden.

Der HerdChek CSFV Ag Serum wartet nun mit einer der PCR fast vergleichbaren Sensitivität auf und wurde konsequenterweise vom FLI für die Diagnostik der Klassischen Schweinepest in Deutschland zugelassen.



Arbeitskreis für veterinärmedizinische
Infektionsdiagnostik (AVID)

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009

Emerging Diseases – Neue Erreger und mögliche Reservoirre

F. Leendertz

Robert Koch-Institut Berlin, Nachwuchsgruppe 2: Neuartige Zoonosen

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Aktuelle BTV-Situation in Deutschland und Europa

F. J. Conraths¹, J. Gethmann¹, C. Probst¹, B. Hoffmann² und M. Beer²

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

¹Institut für Epidemiologie, Wusterhausen

²Institut für Virusdiagnostik, Insel Riems

Am 21. August 2006 wurde die Blauzungenkrankheit, eine nicht kontagiöse, von *Culicoides* spp. (Gnizen) übertragene Orbivirus-Infektion, erstmals in Deutschland festgestellt, nachdem sie zuvor in den Niederlanden und Belgien nachgewiesen worden war. Als Erreger wurde ein Virus des Serotyps 8 (BTV-8) festgestellt. Bis Ende 2006 wurden in Deutschland insgesamt 893 Fälle/Ausbrüche (davon 3 Verdachtsfälle) von Blauzungenkrankheit in Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Hessen und Niedersachsen festgestellt. Im Verlauf des Jahres 2007 trat die Blauzungenkrankheit ab Mai erneut auf, führte zu mehr als 20.600 Neuerkrankungen und zu einer massiven Ausweitung des betroffenen Gebiets.

Die Bekämpfung erfolgt ab Mai 2008 durch Immunisierung der Wiederkäuer mit Serotyp-8-spezifischen Inaktivat-Impfstoffen, mit deren Hilfe die klinischen Symptome der Blauzungenkrankheit unterdrückt werden können. Darüber hinaus sollte durch die Impfung die Übertragung der Infektion und somit die Ausweitung des Endemiegebietes verhindert werden. Langfristiges Ziel ist bisher die Tilgung der Blauzungenkrankheit.

Im Vergleich zum Jahr 2007 reduzierte sich die Zahl der Neuerkrankungen im Jahre 2008 um mehr als 75 %. Durch die Impfung konnte die Ausbreitung von BTV-8 in Richtung Osten weitgehend verhindert werden. Im Zentrum des Gebiets, das in den Jahren 2006 und 2007 betroffen war, lag die Zahl der Neuerkrankungen deutlich unter dem Vorjahresstand. Ursächlich hierfür dürften vor allem die bestehende Immunität nach natürlicher Infektion und die Impfung sein. Trotz der getroffenen Maßnahmen kam es im Verlauf des Jahres 2008 zu neuen BTV-8-Infektionen, die einerseits vor allem Gebiete in Niedersachsen und Schleswig-Holstein und andererseits in Baden-Württemberg betrafen. Die relativ späte Verfügbarkeit der Impfstoffe begünstigte diese Entwicklung. In den ersten vier Monaten des Jahres 2009 wurden 133 Fälle von Blauzungenkrankheit festgestellt, 95 davon in Schleswig-Holstein, 13 in Sachsen-Anhalt, 6 in Niedersachsen, 4 in Bayern, je 3 in Mecklenburg-Vorpommern und Rheinland-Pfalz, je 2 in Hessen, Nordrhein-Westfalen und Thüringen, je einer in Hamburg, im Saarland und in Sachsen. Es ist davon auszugehen, dass sich die betroffenen Tiere größtenteils bereits im Verlauf des Jahres 2008 infiziert hatten. Nur 6 mutmaßlich neue, dem Jahr 2009 zuzurechnende Infektionen wurden seit dem 01.05.2009 festgestellt (Stand: 14.10.2009).

Das Vordringen des Serotyps 1 in Frankreich bedroht weiterhin die Wiederkäuerbestände in Deutschland. Über die aktuelle epidemiologische Situation wird berichtet.

**4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009**

**Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit von inaktivierten BTV-8-
Impfstoffen nach homologem und heterologem Challenge**

M. Beer¹, F. J. Conraths², M. Eschbaumer¹, J. M. Gethmann², H. Heyne⁴, B. Hoffmann¹,
K. Hüttner³, P. König¹, T. C. Mettenleiter¹, C. Probst², J. P. Teifke¹, R. Wäckerlin¹
und M. Ziller²

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Standorte: Insel Riems¹ und Wusterhausen²
Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Rostock³
Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Verbraucherschutz, Schwerin,
Mecklenburg-Vorpommern⁴

Die Blauzungenkrankheit, eine anzeigepflichtige Erkrankung der Wiederkäuer, wird durch das von Gnitzen übertragene Bluetonguevirus (BTV) hervorgerufen und kam bisher in Deutschland nicht vor. Nach ihrem erstmaligen Auftreten im August 2006 breitete sich die Krankheit, in diesem Fall verursacht durch Serotyp 8 des BTV, über ganz Mitteleuropa aus. Seit 2008 wird mit Massenimpfungen versucht, die Krankheit einzudämmen bzw. zu tilgen.

In Deutschland boten 2008 drei Hersteller inaktivierte Impfstoffe gegen BTV-8 an, die allerdings noch keine Zulassung erhalten hatten. Vor deren flächendeckendem Einsatz wurde daher ihre Unbedenklichkeit für Rinder und Schafe in einer Feldstudie überprüft und bestätigt. Die Wirksamkeit der Impfstoffe bei beiden Tierarten konnte in einem Belastungsversuch 3 Monate nach Impfung gezeigt werden.

In Fortsetzung dieser Studie wurde die Langzeitwirkung der eingesetzten Impfstoffe untersucht. Dabei wurden zufällig ausgewählte Tiere 12 Monate nach Impfung einer Belastungsinfektion unterzogen. Außerdem wurde an gezielt ausgewählten Tieren die Schutzwirkung grenzwertig niedriger Antikörperspiegel geprüft. Im Ergebnis zeigte sich hier auch ein Jahr nach Impfung eine sehr gute Immunitätslage bei den untersuchten Rindern und Schafen.

Im Vortrag werden beide Studienabschnitte im Detail vorgestellt und die gewonnenen Daten präsentiert und interpretiert.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Neues zu BTV aus dem Nationalen Referenzlabor

B. Hoffmann, R. Wäckerlin, M. Eschbaumer und M. Beer

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Virusdiagnostik, Insel Riems

Das NRL-BT führte vergleichende Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität von ELISA-Tests zum Nachweis von BTV-Antikörpern durch. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass sich alle zugelassenen Tests zur Herdendiagnostik gut eignen. Jedoch wird deutlich, dass insbesondere bei der Evaluierung von Impferfolgen und beim Nachweis von sehr niedrigen Antikörpertitern, wie sie etwa bei Infektionen in sehr frühen Stadien vorkommen, sehr sensitive Systeme notwendig sind. Hier zeigten sich die beiden Doppelantigen-ELISAs der Firmen Prionics bzw. ID VET (Early Detection) den kompetitiven Assays überlegen. Unter den kompetitiven Systemen erwies sich der IDEXX Pourquier® Bluetongue Competition Kit am sensitivsten, wobei hier ebenfalls die meisten falsch positiven Ergebnisse erzielt wurden. Im Fall eines geimpften Schafes wurden Impfantikörper nur mittels kompetitiver Assays nachgewiesen und das Serum eines weiteren Tieres reagierte nur im Serumneutralisationstest positiv. Daraus lässt sich schließen, dass insbesondere bei der Einzeltierdiagnostik zur Absicherung der Ergebnisse die Untersuchung mit mindestens zwei unterschiedlichen Systemen von Vorteil ist.

Aufgrund von Hinweisen österreichischer Kollegen, dass BTV-8-Genom nach Impfapplikation über einen längeren Zeitraum persistiert, wurde ein Tierversuch am NRL-BT zu diesem Thema durchgeführt. Hierbei wurde der Impfstoff der Firma Merial 2 Schafen subkutan und 2 Schafen intravenös verabreicht und das Vorkommen von BTV-Genom im Blut über einen Zeitraum von 7 Tagen p. i. täglich ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass nur nach intravenöser Applikation BTV-Genome nachweisbar waren und auch hier 4 Tage nach Inokulation kein positiver PCR-Nachweis mehr geführt werden konnte.

Ende November führte das NRL-BT eine Direktabfrage zu den durchgeführten BTV-Untersuchungen in den regionalen Untersuchungseinrichtungen durch. Insgesamt 23 staatliche Labore übermittelten ihre Untersuchungszahlen für den Zeitraum vom 01. Juni bis 10. Oktober 2009. Die entsprechenden Zahlen werden vorgestellt und diskutiert. Auch im Jahr 2009 führte das NRL-BT einen Ringtest durch. Hierbei wurde nicht nur die Leistungsfähigkeit der serologischen und virologischen Diagnostik zur Erkennung von BTV analysiert, sondern auch die Etablierung von BTV-serotypspezifischen Real-Time-RT-PCR zum Nachweis von BTV-8, BTV-6 und BTV-1 kontrolliert. Im Ergebnis kann festgestellt werden, dass sowohl die Pan-BTV-Diagnostik als auch die serotypspezifischen Nachweisverfahren erfolgreich in den regionalen Ämtern etabliert wurden und die BTV-Diagnostik in Deutschland einen hohen Standard besitzt.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Entwicklung eines Real-Time-RT-PCR-Assays zum Nachweis des BTV

H. Marquardt¹, A. Lukas¹, U. Krüger² und S. Schlemm²

¹QIAGEN Hamburg GmbH, ²QIAGEN GmbH, Hilden

Einleitung

Die Blauzungenerkrankung ist eine übertragbare Viruserkrankung bei Rindern, Schafen und anderen Wiederkäuern. Das Virus wird durch Mücken der Gattung *Culicoides* übertragen und in verschiedene Serotypen klassifiziert. Die Symptome reichen von Fieber, Hyperaemie, Speichelfluss, bis hin zur Zyanose, schlechtem Allgemeinzustand und Nachlassen der Milchleistung. Die höchste Morbidität und Mortalität findet sich bei Schafen und kann hier bis zu 40 % erreichen. Bei Rindern liegt sie zwischen 5 % und 10 % der betroffenen Tiere.

Das Blauzungenvirus hat seit seinem Auftreten in Mitteleuropa, im Jahre 2006, großen wirtschaftlichen Schaden angerichtet. Seit Sommer 2009 ist das *cador* BTV RT-PCR Kit erhältlich, das von QIAGEN in Kooperation mit dem Institute for Animal Health (IAH, UK) entwickelt und validiert wurde. Dieses Nachweissystem dient zum Nachweis aller bis dahin bekannten 24 BTV-Serotypen. Es enthält außerdem ein heterologes Amplifikationssystem zur Extraktionskontrolle und der Überprüfung der PCR auf mögliche Inhibition.

Material und Methoden

Das *cador* BTV RT-PCR Assay ist eine Adaptation des von Shaw et al (2007) entwickelten pan-BTV Real-Time-RT-PCR Assays und wurde auf dem Rotor-Gene Q entwickelt. Es ist ein Duplex-Assay zur universellen Detektion der BTV-Serotypen 1 bis 24 sowie der internen Kontrolle.

Zur Entwicklung wurden verschiedene, von der IAH zur Verfügung gestellte Serotypen-RNA verwendet, die aus Europa und anderen Regionen stammen, sowie vorcharakterisiertes BTV-positives und negatives EDTA-Vollblut von Rindern und Schafen.

In der Validierungsphase wurden von der IAH mehr als 100 Feldproben, RNA aller 24 Serotypen und kreuzreaktive Erreger untersucht. Außerdem wurde von verschiedenen veterinärmedizinischen Einrichtungen in Deutschland vorgetestetes Positiv- und Negativmaterial aus der Routinediagnostik zur Verfügung gestellt.

Es wurden Äquivalenzstudien auf verschiedenen Cyclerplattformen, wie ABI PRISM 7500 oder dem Mx3005 von Stratagene durchgeführt.

Ergebnisse

Für das *cador* BTV RT-PCR Kit wurde eine Nachweisgrenze von 0,89 cop/µl Eluat auf dem Rotor-Gene Q gefunden. Alle 24 Serotypen konnten sicher nachgewiesen werden. Es gibt keine Kreuzreaktivitäten mit artverwandten Erregern, wie dem AHSV oder dem EHDV oder Erregern, die im gleichen Probenmaterial vorkommen könnten, wie MKS, BVDV, Border Disease und VSV. In den Untersuchungen mit den Feldproben wurde eine Übereinstimmung von 98 % aller vorgetesteten Proben gefunden. Das Assay zeigt eine hohe Robustheit im Nachweis schwach positiver Proben und ist für die Untersuchung gepoolter Proben geeignet. Zudem wurden sowohl manuelle, als auch automatisierte Aufreinigungsmethoden für die Verwendung im *cador* BTV RT-PCR Kit identifiziert.

Diskussion

Das *cador* BTV RT-PCR Kit wurde von der IAH und QIAGEN validiert und bietet einen sicheren und zuverlässigen Nachweis des Blauzungenvirus aus Rinder- und Schafsblutproben. Eine Zulassung beim FLI wurde beantragt.

Danksagung

1. Institute for Animal Health (Pirbright, UK)
2. Friedrich-Loeffler-Institut (Insel Riems)
3. LVUA (Lebensmittel-, Veterinär- und Umweltuntersuchungsamt Schleswig-Holstein, Neumünster)
4. LUFA (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Nord-West, Oldenburg, Niedersachsen)

Referenz

- [1] Shaw, A.E. et al. (2007) Development and initial evaluation of a Real-Time-RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *Journal of Virological Methods* 145 (2007) 115-126
- [2] Mackay, I.M. (2004) Real-Time-PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 190.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen – ein Informations- und Servicenetzwerk

A. Wiethölter¹, S. Ludwig², S. C. Semmler³ und M. H. Groschup¹

Nationale Forschungsplattform für Zoonosen ¹c/o Friedrich-Loeffler-Institut,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Insel Riems
²c/o Institut für Molekulare Virologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
³c/o Telematikplattform für Medizinische Forschungsnetze e.V., Berlin

Vor dem Hintergrund der Forschungsvereinbarung zu Zoonosen vom 22. März 2006 zwischen den Bundesministerien für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), für Bildung und Forschung (BMBF) und für Gesundheit (BMG) wurde 2009 die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen gegründet. Ziel ist es, durch einen verstärkten Erfahrungsaustausch die Forschungsaktivitäten im Bereich der Zoonosen zu forcieren, die Prävention, Diagnose und Therapie von Zoonosen zu verbessern sowie eine breite horizontale Vernetzung von Human- und Veterinärmedizin zu fördern.

Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen steht allen Wissenschaftlern, die im Bereich Zoonosen in Deutschland forschen, offen. Sie setzt sich aus dem Plenum aller Mitglieder, dem internen Beirat, dem externen Beirat und der Geschäftsstelle zusammen. Die Registrierung als Mitglied ist online unter www.zoonosen.net möglich. Mitglieder werden in den Verteiler der Zoonosenplattform aufgenommen und von der Geschäftsstelle über Aktivitäten und Veranstaltungen informiert. Der interne Beirat wird jährlich durch das Plenum gewählt und besteht aus 15 Wissenschaftlern, die das Steuerungsgremium der Zoonosenplattform bilden und alle wissenschaftsrelevanten Entscheidungen treffen. Der externe Beirat berät die Zoonosenplattform in ihrer wissenschaftlichen Arbeit und strategischen Ausrichtung. Darüber hinaus wirkt er an der fachlichen Begutachtung von Pilot- und Querschnittsprojekten mit.

Die Geschäftsstelle der Forschungsplattform ist an den drei Standorten Berlin (c/o Telematikplattform für Medizinische Forschungsnetze e.V.), Münster (c/o Institut für Molekulare Virologie, Westfälische Wilhelms-Universität) und Greifswald - Insel Riems (c/o Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit) angesiedelt. Durch die drei Standorte werden die universitäre Forschung, die Ressortforschung und die Expertise im infrastrukturellen und organisatorischen Bereich sowie die verschiedenen Fachrichtungen innerhalb der Plattform repräsentiert. Zu den Aufgaben der Geschäftsstelle gehört die Bereitstellung von Infrastruktur, die Registrierung, Harmonisierung und Standardisierung von Ressourcen, die Koordination der Kommunikation und Zusammenarbeit auf nationaler und internationaler Ebene, die Vorbereitung der Vergabe und verwaltungstechnische Betreuung von Pilot- bzw. Querschnittsprojekten und die Öffentlichkeitsarbeit.



**Arbeitskreis für veterinärmedizinische
Infektionsdiagnostik (AVID)**

Am Standort Insel Riems steht die Registrierung, Harmonisierung und Standardisierung der vorhandenen Ressourcen im Vordergrund. Dazu wird aktuell ein Datenbank-Internet-Portal aufgebaut, das eine Übersicht zu Wissenschaftlern, öffentlich geförderten Projekten, Förderungsmöglichkeiten, verfügbaren Zelllinien und vorhandenen Probensammlungen aus Human- und Veterinärmedizin bietet und somit die Vernetzung und Zusammenarbeit auf dem Gebiet der zoonotischen Infektionen fördert. Als zentrales Informations- und Kommunikationsportal dient die Website www.zoonosen.net. Dort finden Sie weitere Informationen, Ankündigungen und aktuelle Termine.

Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen wird mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert.

4. Riemser Diagnostiktage 5./6. November 2009

Molekulare Detektion von Arboviren

M. Eiden, A. V. Rodriguez, M. H. Groschup

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger, Insel Riems

Ein Vielzahl von Infektionen und Erkrankungen werden von Tieren auf Menschen übertragen, wobei in jüngster Zeit vor allem die Ausbreitung viraler zoonotischer Erkrankungen zu beobachten ist. Diese Erkrankungen werden durch verschiedene Faktoren begünstigt, dazu gehören die Globalisierung der Landwirtschaft, vermehrte Reisetätigkeit und Veränderung von Umweltbedingungen (Klima und Ökosysteme). Die Übertragung der Viren kann durch verschiedene Vektoren, vor allem Arthropoden (Stechmücken und Zecken), erfolgen. Daher werden diese Viren als *arthropode-borne-viruses* (Arboviren) bezeichnet. Auch in Deutschland sind Stechmückenarten der Spezies *Anopheles*, *Culex* und *Aedes* sowie verschiedene Zeckengattungen nachgewiesen worden, die potentiell durch Arboviren ausgelöste Krankheiten übertragen können. Darunter fallen das West-Nil-Fieber, Krim-Kongo-Hämorrhagisches Fieber, das Chikungunya Fieber und Equine Enzephalitiden. Um diese neu auftretenden zoonotischen Erkrankungen (*Emerging Diseases*) besser verstehen zu können und das Risiko für das Auftreten dieser Erkrankungen insbesondere in Deutschland schneller einschätzen zu können, ist der Aufbau eines molekularen Nachweissystems für diese Arboviren notwendig. Der Nachweis viraler RNA erfolgt dabei mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR), für die im Augenblick am INNT verschiedene Assays entwickelt werden. Ein Beispiel ist die Entwicklung eines neuen Assays für das West-Nil-Fieber Virus (WNV). Das WNV gehört zur Familie der *Flaviviridae*, Genus *Flavivirus*, wurde 1937 in Uganda entdeckt und wird durch Stechmücken der Gattung *Culex*, *Aedes* und *Anopheles* übertragen. Im Jahr 1999 kam es zu einem Ausbruch des West-Nil-Fiebers im Nordosten der USA und zu einer starken Ausbreitung des Virus, das bereits in mehreren europäischen Ländern nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund laufen in Deutschland Studien zur Virusprävalenz in Tierbeständen, die neben serologischen Screenings auch auf dem molekularen Nachweis mittels qRT-PCR basieren. Zusätzlich zu einem bereits vorhandenen *in-house* Assay wurde daher eine weitere qRT-PCR etabliert, die eine zweite Target-Region der viralen RNA detektiert. Beide Assays besitzen im Vergleich zu bereits publizierten Assays eine höhere Sensitivität für beide Genotyplinien (Linie 1 und 2) des WNV. Zusätzlich wurde eine synthetische positive RNA-Kontrolle entwickelt, die aufgrund einzelner Guanin-Cytosin-Austausche in der Kontroll-Sequenz mit einer spezifischen Sonde von der viralen RNA unterschieden werden kann. Nach Untersuchungen zur Spezifität gegenüber anderen Flaviviren sollen diese Assays für Surveillance-Studien in Deutschland eingesetzt werden.

Weitere real-time Assays werden zur Zeit für Arboviren der Familie der *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* und *Reoviridae* etabliert. Darüber hinaus werden im Augenblick Assays für eine *Pan-Flavi* und *Pan-Alpha* Real-Time-PCR entwickelt.

4. Riemser Diagnostiktage
5./6. November 2009

Neuer ELISA zur Detektion der bovinen Besnoitiose

A. Harris

Prionics Deutschland GmbH, Planegg-Martinsried

Die bovine Besnoitiose wird durch die Infektion mit *Besnoitia besnoiti*, einem einzelligen Parasiten der Familie Sarcocystidae, zu der auch *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* gehören, verursacht. Der Übertragungsweg der Krankheit und der Lebenszyklus des Parasiten sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass eine mechanische Übertragung durch Stechfliegen der Gattung *Tabanus* und *Stomoxys* eine Rolle spielt. Betroffene Rinder durchleben verschiedene Stadien der Krankheit mit unterschiedlichen Symptomen. In der akuten Phase treten Fieber, Ödeme, Gelenkschwellung, Tränen- und Nasenausfluss sowie akute Orchitis auf. In der chronischen Phase kommt es zur Hautverdickung, -verhärtung, Nekrose und Auftreten von Zysten in der Schleimhaut (200 – 600 µm im Durchmesser). Typisch für diese Krankheit sind die in der skleralen Konjunktiva ersichtlichen Zysten. Befallene Stiere können infertil werden. In sehr schweren Fällen führt die Krankheit zum Tod des Tieres. Die bovine Besnoitiose hat sich in den letzten Jahren vom Mittelmeerraum aus ausgebreitet. Im Jahre 2008 wurde erstmals in Bayern eine Herde positiv auf bovine Besnoitiose getestet.

Der PrioCHECK® Besnoitia Ab wurde entwickelt, um Antikörper, die gegen *Besnoitia besnoiti* gerichtet sind, im Serum von Rindern zu erkennen. Der Test, basierend auf der ELISA-Technologie, besteht aus vier Schritten. Neunzig Proben (eine Platte) können in 150 min analysiert werden. In der Validierungsstudie zeigte der Test eine Sensitivität und Spezifität von 98 %.

Infektionen mit *Besnoitia besnoiti* verursachen aufgrund von Leistungseinbußen beträchtliche wirtschaftliche Verluste. Der Gesundheitszustand des Einzeltiers wird stark beeinträchtigt. Da sich die Krankheit in den letzten Jahren stark ausgebreitet hat, ist es äußerst wichtig, infizierte Tiere zu ermitteln, um eine weitere Verbreitung bzw. Einschleppung zu verhindern. Mit dem PrioCHECK® Besnoitia ist es jetzt möglich, ein solches Screening schnell, einfach und effizient durchzuführen.



Arbeitskreis für veterinärmedizinische
Infektionsdiagnostik (AVID)

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Die Veranstalter bedanken sich bei folgenden Firmen für die
Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Tagung:

Applied Biosystems
HAMILTON Robotics GmbH
IDEXX GmbH
ID-Vet
Labordiagnostik Leipzig
Macherey-Nagel GmbH & Co. AG
Metabion GmbH
Pfizer GmbH
Prionics Deutschland GmbH
Qiagen GmbH