

Amtliche Methode und Falldefinition

Afrikanische Schweinepest

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differentialdiagnose	4
1.4 Diagnostische Indikation	5
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	5
1.6 Rechtsgrundlagen.....	5
2. Untersuchungsmaterial	6
3. Untersuchungsgang	10
3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR	10
3.2 Virusisolierung in Makrophagen-/Leukozytenkulturen	11
3.3 Nachweis von ASPV-Antigen	12
3.4 Nachweis ASPV-spezifischer Antikörper	13
Falldefinition - Afrikanische Schweinepest; Virus der Afrikanischen Schweinepest	14

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

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

1.2 Klinische Symptomatik

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

Seit die Afrikanische Schweinepest (ASP) im Jahr 2007 nach Georgien eingeschleppt wurde, hat sie einen Siegeszug über mehrere Kontinente angetreten. Im Bereich der EU sind derzeit alle baltischen Staaten, Polen, Rumänien, Bulgarien, Ungarn, die Slowakei und Deutschland betroffen. Des Weiteren wird die Tierseuche aus Moldawien, Serbien und der Ukraine gemeldet. In Deutschland tritt die ASP seit Herbst 2020 in der Schwarzwildpopulation in der Grenzregion zu Polen in Brandenburg und Sachsen auf. Ausbrüche der ASP beim Schwarzwild in Tschechien und Belgien wurden erfolgreich getilgt und seit Kurzem auch Belgien betroffen. Auf der polnischen Seite sind es derzeit nur noch weniger als 15 km bis zur deutschen Grenze.

Mit dem Eintrag nach China im August 2018 erreichte die Seuche darüber hinaus den weltweit größten Schweineproduzenten und breitet sich dort nach wie vor rasant in der Hausschweinepopulation aus. Es wurde berichtet, dass bis Ende 2019 über 40 % der Schweine Chinas durch die ASP oder die resultierenden Bekämpfungsmaßnahmen getötet worden seien. Von China ausgehend hat sich die Seuche zudem in diversen asiatischen Ländern ausgebreitet. Zu ihnen gehören Laos, Vietnam, die Philippinen, Indonesien, Osttimor, Indien, Malaysia, Korea und die Mongolei.

Auch in Afrika ist eine deutliche Ausbreitungstendenz zu beobachten. Darüber hinaus gibt es seit 1978 ein unabhängiges endemisches Geschehen auf Sardinien. Die Verfütterung von Speiseabfällen und unzureichend

Afrikanische Schweinepest

desinfizierte Schweinetransporter, die aus betroffenen Gebieten zurückkehren, sind Risikofaktoren für die Einschleppung. Generell sind jedoch auch lebende Schweine (inklusive Wildschweine), Sperma sowie tierische Erzeugnisse und Rohstoffe als Einschleppungswege denkbar. Direkte und indirekte Kontakte können in die Übertragung eingebunden sein. Auch Jagdreisen in betroffene Gebiete können ein Risiko darstellen, wenn unzureichend gereinigte Utensilien oder unbehandelte Trophäen mitgebracht werden.

Nach einer Inkubationszeit von zwei bis sieben Tagen (die im EU-Recht angenommene maximale Inkubationszeit beträgt 45 Tage) entwickeln die betroffenen Tiere hohes Fieber und schwere, unspezifische Allgemeinsymptome (Futterverweigerung, Mattigkeit, Bindehautentzündungen, Bewegungsstörungen, Diarrhoe, stark erhöhte Atemfrequenz). Trächtige Sauen können verferkeln. Bei akuten Verläufen kann es zur Ausprägung hämorrhagischer (Petechien in Haut und Schleimhaut, Nasenbluten, blutige Diarrhoe) und neurologischer Symptome kommen. Die aktuell in Europa kursierenden Viren sind mit wenigen Ausnahmen hoch virulent und verursachen ein schweres, nahezu altersunabhängiges, unspezifisches Krankheitsbild, das nach sieben bis zehn Tagen mit dem Tod des Tieres endet (Letalität nahezu 100 %). Die klinischen Anzeichen unterscheiden sich grundsätzlich nicht bei Haus- und Wildschweinen. Unter Feldbedingungen werden erkrankte Wildschweine aber häufig durch Verlust der Scheu, desorientiertes Herumwandern und Bewegungsstörungen auffällig.

Die Virusausscheidung beginnt bei den betroffenen Schweinen in der Regel am 2. bis 4. Tag nach der Infektion und dauert über längere Zeit (unter experimentellen Bedingungen am FLI stammabhängig bis zu 90 Tage, in der Literatur sind 12 Monate genannt) bzw. bis zum Tod des Tieres an. Nach akut-letalen Verläufen sind eher selten Antikörper nachweisbar; bei subakuten, chronischen oder transienten Verläufen sind ca. sieben bis zehn Tage nach der Infektion Antikörper nachweisbar. Für sich alleine genommen, haben die Antikörper keine Vorhersagekraft für den Ausgang der Erkrankung und sind kein Hinweis auf einen Carrierstatus.

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

1.3 Differentialdiagnose

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

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

1.4 Diagnostische Indikation

Gemäß Schweinepest-Verordnung in der jeweils gültigen Fassung.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

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

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

1.6 Rechtsgrundlagen

- Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung
- Ab 21.04.2021:
- ~~Verordnung 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“) Richtlinie 2002/60/EG des Rates vom 27. Juni 2002 zur Festlegung von besonderen Vorschriften für die Bekämpfung der Afrikanischen Schweinepest [...] in der jeweils gültigen Fassung~~
- ~~Entscheidung 2003/422/EG der Kommission vom 26. Mai 2003 zur Genehmigung eines Diagnosehandbuchs für die Afrikanische Schweinepest in der jeweils gültigen Fassung~~
- Durchführungsverordnung zu besonderen Kontrollmaßnahmen ASP (SANTE/7260/2020)
- Durchführungsbeschluss 2014/709 der Kommission mit tierseuchenrechtlichen Maßnahmen zur Bekämpfung der Afrikanischen Schweinepest in bestimmten Mitgliedstaaten und zur Aufhebung des Durchführungsbeschlusses 2014/178/EU

Afrikanische Schweinepest

2. Untersuchungsmaterial

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

Aufgrund der epidemiologischen Situation ist bei Bei einem Verdacht auf Schweinepest **sollte grundsätzlich immer auf KSP und ASP zu untersuchen werden. Ausnahmen stellen klare epidemiologische Zusammenhänge mit einer der Tierseuchen dar.** Es ist zu empfehlen, geeignetes Probenmaterial gekühlt für eine Weiterleitung ans NRL zurückzuhalten.

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

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

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

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

Bei der Wahl der Probenmatrizes für die Schweinepestdiagnostik sind a) unterschiedliche Szenarien und b) optimale vs. minimale Probensets zu unterscheiden.

Im konkreten Verdachts- und Ausbruchsfall „ASP“

Da das Virus der Afrikanischen Schweinepest insbesondere Erythrozyten-assoziiert im Blut vorliegt, ist der sensitivste Genomnachweis aus einer EDTA-Blutprobe zu führen. Dabei ist zu beachten, dass insbesondere hohe Einsatzvolumina und frische Proben in säulenbasierten Extraktionssystemen zu einer erhöhten Inhibitionsrate führen können. Dies geht so weit, dass stark positive Proben ein negatives Ergebnis erbringen (bei gleichzeitigem Ausfall der internen Kontrolle). Bisher gibt es keine Hinweise auf derartige Probleme in magnetpartikelbasierten Systemen. **Eine Verdünnung der Proben kann in vielen Fällen das Problem beheben, ohne die Sensitivität maßgeblich zu beeinträchtigen.** Serum ist insbesondere in der frühen und späten Phase der Infektion deutlich geringer in der Last viralen Genoms und ist daher nicht die Probenmatrix der Wahl und grundsätzlich nur für die PCR-Diagnostik klinisch auffälliger Tiere (siehe unten) geeignet. Serum ist allerdings die beste Probenmatrix für die Serologie. Plasma, das aus EDTA-Blutproben gewonnen wird, kann

auch für den Antikörpernachweis eingesetzt werden, wenn z. B. keine Serumprobe zur Verfügung steht. Einige ELISA Kits sind allerdings nur für Serum zugelassen (z. B. Ingezim PPA, Ingenasa).

Generell ist virales Genom in diversen Probenmatrizes unterschiedlichster Qualität robust nachweisbar. Soll Virus für weitere Untersuchungen isoliert und vermehrt werden, gelingt dies am besten aus einer möglichst frischen Milzprobe, so dass die Kombination aus EDTA-Blut und Milz gut, eine zusätzliche Serumprobe optimal ist.

Jüngste Validierungsstudien haben gezeigt, dass auch trockene Blut tupfer (bestenfalls forensische Tupfer oder Tupfer in inaktivierenden Transportmedien, z. B. Genotubes oder PrimeSwabs) sowohl für den Genomnachweis als auch die Serologie nutzbar sind. Diese Tupfer sind jedoch mit einem höheren Aufwand im Labor verbunden, so dass man sie besonders dort einsetzen sollte, wo die Entnahme anderer Matrizes schwierig ist (insbesondere Fallwild). Eine Virusisolierung aus trockenen Tupfern gelingt nur selten, maximal über einen Zeitraum von drei Tagen. Im Falle der Tupfernahme in gefährdeten Gebieten sind die Einzelheiten mit den zuständigen Einrichtungen abzustimmen. Grundzüge der Tupferbeprobung und -aufarbeitung sind in folgendem Handlungshinweis zu finden: https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00004583.

Die folgende Tabelle fasst die Probenmatrizes für unterschiedliche, **ASP-spezifische** Szenarien zusammen:

	Hausschwein	Wildschwein
<p>Untersuchungen im Rahmen der passiven Surveillance inklusive Verdachts- und Ausschlussdiagnostik sowie Untersuchungen in Anwendung des Artikels 3 Absatz 3 des Durchführungsbeschlusses 2014/709/EU (Beprobung von Falltieren und klinisch auffälligen Tieren)</p> <p><i>Grundannahme: Kranke Tiere mit hoher Viruslast, der Erregernachweis steht im Vordergrund</i></p>	<p><u>Bevorzugte Probenmatrizes:</u> EDTA-Blut (ggf. Herzblut), Milz, Tonsille, Lymphknoten (auch periphere), Lunge</p> <p>Weitere Probenmatrizes: Bei Falltieren aus Restriktionszonen inkl. Frühwarnsystem: in Absprache mit der zuständigen Behörde ggf. Blut tupfer (Serum ist aufgrund der deutlich geringeren Viruslast weniger gut geeignet)</p> <p><u>Pooloption:</u> Grundsätzlich bis zu 5 Proben (Probenqualität beachten)</p>	<p><u>Bevorzugte Probenmatrizes:</u> EDTA-Blut, Blut tupfer, Milz, Lymphknoten, Lunge</p> <p>Weitere Probenmatrizes Tonsille, Röhrenknochen oder Sternum bei skelettierten Kadavern (diagnostische Eignung ist eingeschränkt) (Serum ist aufgrund der deutlich geringeren Viruslast weniger gut geeignet)</p> <p><u>Pooloption:</u> Grundsätzlich bis zu 5 Proben (Probenqualität beachten) Kein Poolen von Proben aus Knochen</p>
<p>Untersuchungen klinisch unauffälliger, lebender und gesund erlegter Tiere in den Restriktionszonen</p>	<p><u>Probenmatrix:</u> EDTA-Blut</p> <p><u>Pooloption:</u> Bis zu 5 Proben</p>	<p><u>Probenmatrizes:</u> EDTA-Blut, Milz, Tonsille*</p> <p>In den Restriktionszonen zusätzlich: Blut tupfer in Absprache mit der zuständigen Behörde (wären grundsätzlich auch für die Serologie geeignet)</p>

Afrikanische Schweinepest

<p>Untersuchungen im Rahmen der aktiven Surveillance</p> <p><i>Grundannahme: Gesunde Tiere mit geringer bis sehr geringer Viruslast</i></p>		<p>(Serum ist aufgrund der deutlich geringeren Viruslast weniger gut geeignet)</p> <p><u>Pooloption:</u> Grundsätzlich bis zu 5 Proben (Probenqualität beachten)</p> <p>Kein Poolen von Serum- oder Tupferproben (sind bei gesunden Tieren schon am Detektionslimit)</p>
<p>Untersuchungen im Rahmen der Seuchenbekämpfung und ggf. in Pufferzonen</p>	<p><u>Zusätzlich: Serum für optimalen Antikörpernachweis in allen zugelassenen Testsystemen</u></p>	<p><u>Zusätzlich: Serum für optimalen Antikörpernachweis in allen zugelassenen Testsystemen</u></p>

* Serum klinisch unauffälliger Tiere sollte nur untersucht werden, wenn keine anderen, besser geeigneten Probenmatrizes vorhanden sind.

In „Friedenszeiten“:

Wenn eine Monitoringprobe umfassend sowohl auf Klassische als auch auf Afrikanische Schweinepest untersucht werden soll, sind bei der Auswahl der Probenmatrizes Kompromisse zu schließen. Hier haben Validierungsstudien gezeigt, dass Serum eine Probenmatrix ist, die sich grundsätzlich für alle Tests eignet, und gut in automatisierten Systemen einsetzbar ist. Serum ist auch für die zellkulturbasierten Bestätigungsmethoden der KSP-Serologie optimal, die mit Plasma u. U. deutliche Probleme aufweisen. Für die ASP-Diagnostik nimmt man in Kauf, dass Serum eine geringfügig verminderte PCR-Sensitivität mit sich bringt (siehe oben). Die zusätzliche Übermittlung einer Milzprobe gleicht diesen Umstand aus, da sie für alle Methoden der Erregerdetektion (KSP und ASP) gut geeignet ist. KSP lässt sich zudem sehr gut aus Tonsillen und Lymphknoten isolieren.

Für die Untersuchung von Fallwild im Rahmen der passiven Surveillance **in freien Gebieten (siehe KSP)** eignen sich **alternativ** in Blut bzw. bluthaltige Körperflüssigkeit getauchte Tupfer (s. o.).

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

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

Afrikanische Schweinepest

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

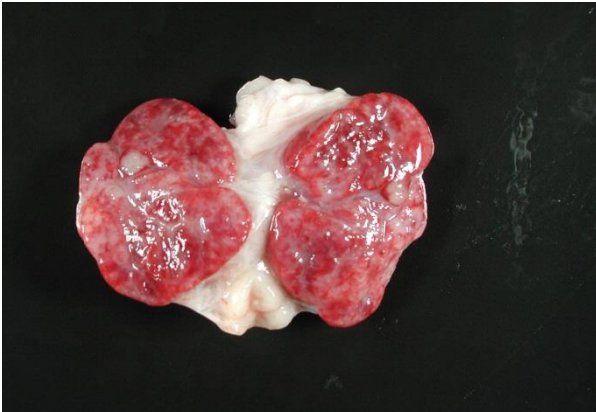


Abbildung 1: Diffuse Blutungen im Mandibularlymphknoten

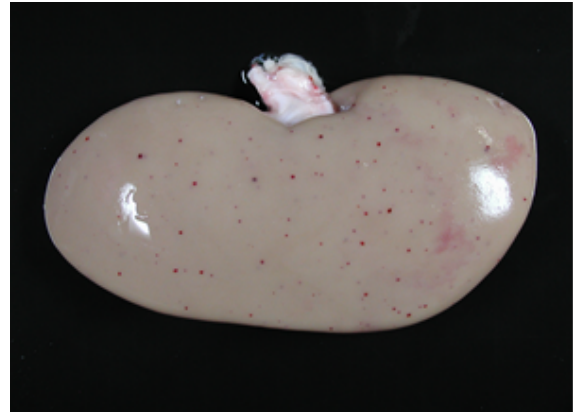


Abbildung 2: Petechien in der Niere

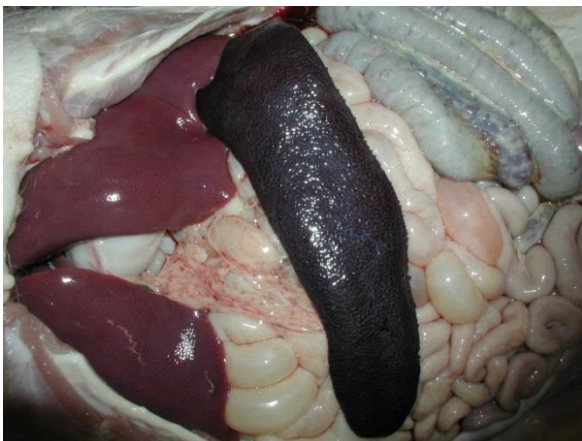


Abbildung 3: Splenomegalie



Abbildung 4: Ebenholzfarbene gastro-hepatische Lymphknoten

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

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

Afrikanische Schweinepest

Im Anschreiben ist anzugeben:

- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. dienstlicher und eventuell privater Telefon- und Fax-Nummer)
- Was wird eingesandt? (Art des Materials, von welchen Tieren, Anzahl etc.)
- Aus welchem Bestand stammen die Proben?
- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)

Zusätzliche Angaben, soweit möglich:

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

3. Untersuchungsgang

Die Laboruntersuchungen sind grundsätzlich nach den Empfehlungen des EU Referenzlabors durchzuführen. Für die Untersuchung ist die Entscheidung 2003/422/EG (Diagnosehandbuch) maßgeblich. Die folgenden Ausführungen dienen daher nur der Erläuterung bzw. Konkretisierung des Vorgehens in Deutschland.

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

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

3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR

Der Nachweis von ASPV-Genom erfolgt über zugelassene oder OIE-gelistete real-time PCR-Protokolle (King *et al.*, J Virol Methods. 2003 Jan;107(1):53-61). Diese dienen dem sensitiven Nachweis von ASPV-Genom in Blut-, Serum-, Organ- und Tupferproben sowie Zellkulturüberständen. Die hohe Sensitivität der Testverfahren erlaubt grundsätzlich das Zusammenführen (Poolen) mehrerer Proben, wobei die Probenqualität, Praktikabilität, das Untersuchungsziel und die Epidemiologie beachtet werden sollten (s. o.). Insbesondere im Rahmen des Fallwildmonitorings ergeben sich häufig Situationen, die eine Einzeltestung sinnvoll erscheinen lassen. Dazu gehören geringer Probenanfall, schlechte Probenqualität und Kenntnis über inhibitorische Effekte von Einzelproben. Proben von Hausschweinen, die als Stichprobe eines klinisch unauffälligen Bestandes oder einer Schweinepartie im Rahmen der Verbringungsuntersuchungen nach Schweinepestverordnung genommen wurden, sollten aufgrund der geringen angenommenen Virusprävalenz und -last einzeln untersucht werden.

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

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

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

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

- INgene q PPA (Ingenasa)
- virotype ASFV und virotype ASFV 2.0 (Indical) (~~Indical, ehemals Qiagen Leipzig~~)
- ID Gene ASF Duplex (IDvet)
- RealPCR ASFV (IDEXX)
- SwineFever combi (gerbion) zum Nachweis von KSPV und ASPV
- ViroReal Kit ASF Virus (Ingenetix)
- Kylvet ASF Real-Time PCR (Anicon)
- VetMAX African Swine Fever Virus Detection Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Adiavet ASFV Fast Time (BioX)
- virellaASFV seqc real time PCR Kit (gerbion)

Die aktuelle Liste der zugelassenen Mittel kann auf der Seite der Zulassungsstelle eingesehen werden: https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf

3.2 Virusisolierung in Makrophagen-/Leukozytenkulturen

Die Anzucht von ASPV erfolgt primär als Hämadsorptionstest. Er dient dem Nachweis von vermehrungsfähigem ASPV aus Blut-, Gewebe- und Tupferproben in primären Blutmonozyten (PBMCs) bzw. daraus generierten Makrophagenkulturen. Es handelt sich um einen Bestätigungstest, der insbesondere im Ausbruchsfall

Afrikanische Schweinepest

zum Einsatz kommt, und im OIE-Manual beschrieben ist. Der Test ist bei entsprechender Erfahrung hoch sensitiv, ist jedoch nicht für alle ASPV-Isolate aussagekräftig, kann durch bestehende Antikörperreaktionen behindert werden, und muss daher von anderen Testsystemen begleitet werden.

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

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

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

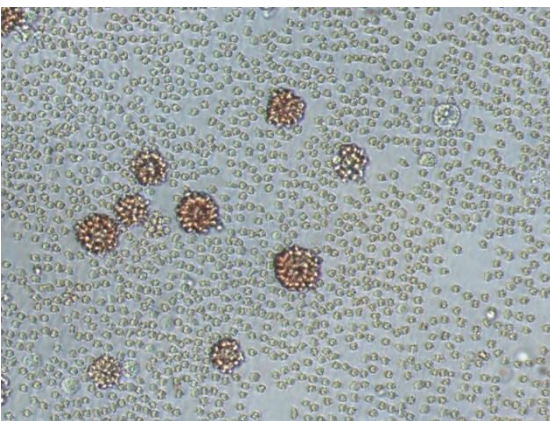


Abbildung 5: Positiver HämadSORPTIONSTEST 48 Stunden nach Inokulation eines positiven Serums

3.3 Nachweis von ASPV-Antigen

Für den Nachweis von ASPV-Antigen steht ein kommerzieller ELISA zur Verfügung, der jedoch nur in Ausnahmefällen zum Einsatz kommt und nicht zugelassen ist. Gleiches gilt für einen Antigen Lateral Flow Assay. Letzterer erlaubt den Antigennachweis in wenigen Minuten. Kranke Tiere werden im Regelfall erkannt. In Kryoschnitten bzw. Milzabklatschpräparaten kann virales Antigen mittels Immunfluoreszenz- oder Immunperoxidasefärbung nachgewiesen werden.

Zeitaufwand: ca. ein Tag

3.4 Nachweis ASPV-spezifischer Antikörper

Für die serologische Diagnostik der ASP stehen derzeit drei zugelassene kommerzielle ELISA-Systeme zur Verfügung. Die Testsysteme bedienen sich verschiedener Antigene und werden daher u. U. parallel eingesetzt. Neben einem Blocking ELISA auf der Basis des p72 (INGEZIM PPA COMPAC, Ingenasa), ist ein indirektes Testsystem verfügbar, das sich einer Antigenmischung aus p72, p62 und p32 (ID Screen® African Swine Fever Indirect ELISA, IDvet) bedient. Darüber hinaus wurde kürzlich ein kompetitiver ELISA auf der Basis des p32 (ID Screen African Swine Fever Competition, IDVet) zugelassen.

Zeitaufwand: ca. ein Tag

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

Zusätzlicher Zeitaufwand: ein bis zwei Tage

Ein Antikörper Lateral Flow Assay hat sich als schnell, robust und sensitiv erwiesen, ist jedoch nicht zugelassen und wird nur im Ausnahmefall eingesetzt.

Falldefinition - Afrikanische Schweinepest; Virus der Afrikanischen Schweinepest

Klinisches Bild

Fieberhafte Allgemeinerkrankung der Schweine mit seuchenhaftem Verlauf, hoher Morbidität und Mortalität.

Inkubationszeit: beim Einzeltier fünf bis 15 Tage.

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

Erregernachweis:

- Virusisolierung (Hämadsorptionstest)
- Antigennachweis (IFT)
- Genomnachweis (PCR)

Indirekter Nachweis:

- Antikörpernachweis (ELISA, IPT)

Zusatzinformation

Die Laboruntersuchungen sind grundsätzlich nach den Empfehlungen des EU Referenzlabors ~~nach Maßgabe des Handbuchs zur Diagnose der Afrikanischen Schweinepest (2003/422/EG)~~ durchzuführen. Anhand von klinischen oder pathologisch-anatomischen Befunden kann nur der Verdacht einer ASP-Infektion geäußert werden. Die Bestätigung des Verdachtes erfolgt anhand von Labortests im Nationalen Referenzlabor (FLI).

Epidemiologischer Zusammenhang

Epidemiologischer Zusammenhang mit einem labordiagnostisch nachgewiesenen ASP-Ausbruch.

Voraussetzung für den Verdacht

Wenn das Ergebnis einer klinischen oder pathologisch-anatomischen Untersuchung den Ausbruch der ASP befürchten lässt.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:

Wenn aufgrund von virologischen (Virus-, Antigen- oder Genomnachweis) oder serologischen Untersuchungen (Antikörpernachweis) die Erkrankung diagnostiziert wird.

Rechtsvorschriften

- Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest in der jeweils geltenden Fassung.
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung
- Ab 21.04.2021:
- Verordnung 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung zu besonderen Kontrollmaßnahmen ASP (SANTE/7260/2020)
- Durchführungsbeschluss 2014/709 der Kommission mit tierseuchenrechtlichen Maßnahmen zur Bekämpfung der Afrikanischen Schweinepest in bestimmten Mitgliedstaaten und zur Aufhebung des Durchführungsbeschlusses 2014/178/EU