

Amtliche Methode und Falldefinition

Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus, Goatpox virus*)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik.....	3
1.3 Differentialdiagnose	3
1.4 Diagnostische Indikation	3
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	3
1.6 Rechtsgrundlagen.....	4
2. Untersuchungsmaterial	4
3. Untersuchungsgang	4
3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR.....	4
3.2 Virusisolierung	7
3.3 Antikörpernachweis.....	7
Falldefinition - Pockenseuche der Schafe und Ziegen; Capripoxvirus	8

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Das Schafpockenvirus (Sheeppox Virus; SPPV) und das Ziegenpockenvirus (Goatpox Virus, GTPV) sind genetisch sehr nah verwandt und werden dem Genus Capripoxvirus zugeordnet. Dieses Genus gehört zur Subfamilie der *Chordopoxvirinae* innerhalb der Familie *Poxviridae*. Es unterscheidet sich genetisch von dem ebenfalls zum *Capripoxvirus* gehörenden Lumpy skin disease Virus (LSDV).

1.1.1 Vorkommen

Schaf- und Ziegenpocken kommen in Teilen Afrikas und Asiens, im Mittleren Osten und auf dem indischen Subkontinent vor. In Europa wurde der Erreger bisher nur in südlichen Ländern diagnostiziert.

1.2 Klinische Symptomatik

Das Krankheitsbild ist anfänglich durch Fieber, Speicheln sowie Nasen- und Augenausfluss geprägt. Innerhalb weniger Tage bilden sich Knötchen, später Papeln und Vesikel im Kopfbereich, in der Genitalregion und am Euter. Das Abheilen der Veränderungen kann bis zu sechs Wochen dauern. Hohe Verluste treten besonders bei Lämmern auf, wenn die Schleimhäute des Verdauungs- und Respirationstraktes durch massive Läsionen in Mitleidenschaft gezogen worden sind und sich sekundäre Komplikationen durch bakterielle Infektionen einstellen.

1.3 Differentialdiagnose

Die wichtigsten Differentialdiagnosen der Hautveränderungen werden hervorgerufen durch das Parapockenvirus (Orf-Virus), das Bluetongue-Virus und das Maul-und-Klauenseuche-Virus.

1.4 Diagnostische Indikation

Klinischer oder epidemiologisch begründeter Verdacht

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Nationales Referenzlabor (NRL) für Schaf- und Ziegenpocken, Südufer 10, D-17493 Greifswald-Insel Riems

Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus*, *Goatpox virus*)

1.6 Rechtsgrundlagen

- Tiergesundheitsgesetz in der jeweils gültigen Fassung
- Richtlinie 92/119/EWG des Rates vom 17. Dezember 1992 mit allgemeinen Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung bestimmter Tierseuchen [...]

2. Untersuchungsmaterial

Am besten geeignet für die Virusisolierung sind Biopsie-Material aus frischen Hautläsionen und *post mortem* ebenfalls Hautveränderungen sowie befallene Lymphknoten und Lungengewebe. Auch EDTA-Blut, Serum sowie Nasentupfer können für die Untersuchung auf Virusgenom mittels PCR verwendet werden. Darüber hinaus kann Serum für serologische Untersuchungen genutzt werden. Das Probenmaterial sollte gekühlt bei +4°C versendet werden.

3. Untersuchungsgang

3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR

Als real-time Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von viraler DNA des Genus Capripoxvirus wird vom FLI ein Protokoll basierend auf der Veröffentlichung von Bowden *et al.* (2008) *Virology* 371: 380-399: "Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats." bzw. Stubbs *et al.* (2012) *J. Virol. Methods* 179(2): 419-22: "Validation of a high-throughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA" empfohlen. Der Assay amplifiziert ein 89 bp-Fragment des P32-Genes. Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Extraktion und Amplifikation wurde dieser Capri-p32-Assay-1 mit einem internen Kontroll-Assay in einer duplex-qPCR kombiniert. Bei den internen Kontrollen handelt es sich einmal um ein universelles internes Kontrollsystem (Hoffmann *et al.*, 2006; vertrieben durch Qiagen Leipzig) basierend auf IC2-DNA und andererseits um die Co-Amplifizierung eines „housekeeping gene“ beta-Aktin (Toussaint *et al.*, 2007, modifiziert). Hierbei werden die Sonde und der Reverse-Primer des beta-Aktin-Assay 2 (nach Toussaint *et al.*, 2007) mit einem neuen Forward-Primer kombiniert. Dieser neue Forward-Primer ist nicht mehr nur mRNA-spezifisch, sondern amplifiziert auch sehr erfolgreich die genomische beta-Aktin-DNA aller bisher getesteten Vertebraten. beta-Aktin-Genes (Wernike *et al.*, 2011).

Zur DNA-Extraktion sollte der QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), der PCR Template Preparation Kit (Roche) oder vergleichbare Systeme verwendet werden.

Die Amplifizierung erfolgt auf Basis des QuantiTect Multiplex-PCR Kit no ROX (Qiagen, Art-Nr: #204741, Art-Nr: #204743 oder Art-Nr: #204745) oder des PerfeCTa qPCR ToughMix (VWR Art-Nr: #733-2092, Art-Nr: #733-2090 oder Art-Nr: #733-2091) in 12,5 µl Gesamtvolumen.

Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus, goatpox Virus*)

Sollte eine andere chemische Basis für die Detektion genutzt werden, muss in Vergleichsexperimenten die Sensitivität und Spezifität der verwendeten Reagenzien gezeigt werden.

Als Kontrollen werden neben DNA-Isolierungskontrolle/n (DIC) eine „No Template“ Kontrolle (NTC) und mindestens eine positive Kontrolle (PC) mitgeführt. Als positive Kontrolle sollte eine gering konzentrierte Capripox-DNA zur Anwendung kommen.

Zu den vorgelegten 10 µl Mastermix werden 2,5 µl DNA-Template pipettiert.

3.1.1 Datenanalyse

HEX-Kanal:

Für alle Gewebeproben und die entsprechende DIC sollte die IC mit einem vergleichbaren Threshold-Cycle (Ct) nachweisbar sein. Sind die Ct-Werte für die genannten Proben vorhanden, ist von einer erfolgreichen DNA-Isolierung und PCR auszugehen. Ist kein Ct-Wert für die IC feststellbar und gleichzeitig auch keine Capripox-spezifische Amplifizierung aufgetreten, ist die real-time PCR nicht auswertbar und somit ist die DNA-Isolierung und/oder die PCR zu wiederholen.

Für die NTC (SDW) sollte kein Ct-HEX-Wert feststellbar sein.

FAM-Kanal:

Für die PC sollte ein Ct-Wert feststellbar sein. Hiermit wird die Funktion des Capripox-Genom-Detektionssystems sichergestellt. Ist für die PC kein Ct-Wert feststellbar, ist die PCR mit einem neuen Capripox-Mix1 und/oder einer neuen PC zu wiederholen.

Für die DIC und die NTC sollte kein Ct-FAM-Wert feststellbar sein.

Wenn alle eingesetzten Kontrollen in richtiger Weise reagieren, ist eine Auswertung der Feldproben-Ansätze möglich.

Eine Capripocken-Verdachtsprobe wird dann als positiv/verdächtig in der PCR gewertet, wenn ein Ct-FAM-Wert für die entsprechende Probe festgestellt wird oder ein signifikanter Anstieg der FAM-Fluoreszenz über das Basislevel festzustellen ist.

Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus*, *Goatpox virus*)

Herstellung der Primer-Sonden-Mixe

Capri-p32-Mix-1-MGB: (Original Bowden Assay)

(Bowden *et al.*, Virology 371 (2008) 380-399)

Volumen	Oligo (100 pmol/μl)	Sequenz der Primer/Sonde (5` - 3`)
15,0 μl	Capri-P32for	AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA
15,0 μl	Capri-P32-rev	AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA
5,0 μl	Capri-P32-FAM-MGB	FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT-MGB
165,0 μl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200,0 μl	Capri-p32-Mix-1-MGB	

Capri-p32-Mix-1-Taq: (alternative TaqMan Sonde):

(Primer: Bowden *et al.*, 2008, Sonde: bernd.hoffmann@fli.de bzw. Dietze *et al.*, 2018)

Volumen	Oligo (100 pmol/μl)	Sequenz der Primer/Sonde (5` - 3`)
15,0 μl	Capri-P32for	AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA
15,0 μl	Capri-P32-rev	AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA
5,0 μl	Capri-P32-FAM-Taq	FAM-ATG GAT GGC TCA TAG ATT TCC TGA T-BHQ1
165,0 μl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 μl	Capri-p32-Mix-1-Taq	

beta-Actin-DNA-Mix2-HEX:

(Basierend auf einer Publikation von Toussaint *et al.*, 2007, modifiziert) (Wernike *et al.*, 2011)

Volumen	Oligo (100 pmol/μl)	Sequenz der Primer/Sonde (5` - 3`)
5,0 μl	ACT2-1030-F	AGC GCA AGT ACT CCG TGT G
5,0 μl	ACT-1135-R	CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T
5,0 μl	ACT-1081-HEX	HEX- TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T -BHQ1
185,0 μl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 μl	beta-Actin-DNA-Mix2-HEX	

Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus, goatpox Virus*)

EGFP-Mix 1 (limit 5) HEX

(Hoffmann *et al.*, 2006, J. Virol. Methods 136, 200-9)

Volumen	Oligo (100 pmol/μl)	Sequenz der Primer/Sonde (5` - 3`)
5,0 μl	EGFP1-F	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC
5,0 μl	EGFP2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G
5,0 μl	EGFP-Probe 1	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1
185,0 μl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 μl	EGFP-Mix 1 (limit 5) HEX	

Die Speziesbestimmung des Virus erfolgt durch Sequenzierung bestimmter Abschnitte des viralen Genoms. Darüber hinaus bestehen PCR-basierte Detektionsverfahren für die differentialdiagnostisch relevanten Vertreter des Genus *Parapoxvirus* und *Orthopoxvirus*.

3.2 Virusisolierung

Eine Virusanzucht erfolgt im Fall von Schaf- und Ziegenpocken auf der Zelllinie SFT-R (Schafthymus) Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine CCLV-RIE43.

3.3 Antikörpernachweis

Für den Nachweis von SPPV- und GTPV-Antikörpern stehen verschiedene serologische Tests zur Verfügung. Für geringe Probenzahlen können der Serumneutralisationstest sowie der indirekte Immunfluoreszenztest verwendet werden. Beide Verfahren sind am NRL etabliert. Für die Etablierung ist ein Labor der Schutzstufe 3 notwendig.

Für den breiten Einsatz steht ein zugelassener, kommerzieller Capripox-Doppel-Antigen-ELISA der Firma IDvet zur Verfügung, der sich durch hohe Spezifität und Sensitivität auszeichnet. Dieser ELISA ermöglicht die serologische Untersuchung von Proben auch in Laboren ohne Schutzstufe 3.

Eine serologische Unterscheidung von Antikörpern gegen SPPV, GTPV und LSDV ist nicht möglich. Auch können aktuell Impfantikörper nicht von Feldvirusantikörpern unterschieden werden.

Falldefinition - Pockenseuche der Schafe und Ziegen; Capripoxvirus

Klinisches Bild

Die echten Pocken der kleinen Wiederkäuer werden vom Schafpocken-Virus (SPPV) und dem Ziegenpocken-Virus (GTPV) des Genus Capripoxvirus der Familie *Poxviridae* hervorgerufen. Beide sind eng mit dem Lumpy-skin-disease-Virus verwandt. Die Pocken der kleinen Wiederkäuer sind in Südost-Europa, Asien und Afrika verbreitet. Das Virus wird von akut oder klinisch inapparent kranken Tieren ausgeschieden. Je nach Verlaufsform schwankt die Mortalität zwischen 2 % und 50 % bzw. 80 % bei Lämmern. Bei manchen europäischen Schafrassen (Soay) kann eine perakute Infektion ohne das Auftreten typischer Hautläsionen einhergehend mit hoher Letalität vorkommen. Nach initialen Fieberschüben entwickeln sich im Verlauf von fünf Tagen Hauterosionen, die in typische Papeln und Vesikel übergehen und generalisiert besonders an unpigmentierten Hautstellen auftreten; starke Ödeme und Lymphknotenschwellungen treten besonders am Kopf auf. Tiere, die eine Infektion mit den Pocken der kleinen Wiederkäuer überstehen, erwerben eine solide Immunität.

Inkubationszeit: sechs bis zehn Tage

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Elektronenmikroskopie
- Virusisolierung aus Biopsiematerial veränderter Gewebe
- Virusgenomnachweis (quantitative PCR)

Indirekter Erregernachweis:

- Antikörperbestimmung (ELISA, SNT, indirekte Immunfluoreszenz)

Differentialdiagnose

Parapoxvirus ovis (weltweite Verbreitung, Zoonoseerreger)

Epidemiologischer Zusammenhang

Die Verbreitung von Capripoxvirus erstreckt sich über den gesamten Nahen und Fernen Osten, Asien und Afrika. Einschleppungen nach Europa wurden in den letzten Jahren vor allem in Südosteuropa, meist über die Türkei registriert. Die Empfänglichkeit für Capripoxviren kann abhängig von der Rasse (besonders bei Ziegen) stark variieren. Seit langer Zeit kein Auftreten in der Bundesrepublik Deutschland.

Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus*, *goatpox Virus*)

Voraussetzung für den Verdacht

Vorliegen klinischer oder epidemiologischer Hinweise

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:

Erregernachweis bzw. Erregergenomnachweis oder indirekter Erregernachweis zusammen mit klinischen oder epidemiologischen Hinweisen.

Rechtsvorschriften

Richtlinie 92/119/EWG des Rates vom 17. Dezember 1992 mit allgemeinen Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung bestimmter Tierseuchen [...], geändert durch die Beitrittsakte in der Fassung des Ratsbeschlusses vom 1. Januar 1995 (ABl. EG Nr. L 1 S.1).

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.de