

Amtliche Methode und Falldefinition

SARS-CoV-2-Infektion bei gehaltenen Tieren

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	2
1. Charakterisierung der Infektion	2
1.1 Erreger	2
1.2 Klinische Symptomatik.....	2
1.3 Differentialdiagnose	2
1.4 Diagnostische Indikation	2
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	2
1.6 Rechtsgrundlagen.....	3
2. Untersuchungsmaterial	3
2.1 Vorsichtsmaßnahmen	3
2.2 Probenmaterial	3
2.3 Zeitpunkt der Probenahme	3
2.4 Probenversand	3
3. Untersuchungsgang	4
3.1 Virusnachweis	4
3.1.1 RT-qPCR zum Nachweis des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2	4
3.1.1.1 RNA-Isolierung	4
3.1.1.2 RT-qPCR zum Nachweis des E-Gens	4
3.1.1.3 RT-qPCR zum Nachweis des RdRp-Gens	6
3.1.1.4 Auswertung der PCRs	8
3.2 Antikörpernachweis	9
3.3 Literatur:.....	10
Falldefinition - SARS-CoV-2-Infektion	11

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Bei dem Erreger der Infektionskrankheit COVID-19 handelt es sich um das neue Coronavirus SARS-CoV-2. Dieser erstmals Ende 2019 in China nachgewiesene Erreger stammt mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einem tierischen Reservoir und ist damit als zoonotischer Erreger anzusehen. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt über Tröpfchen (Aerosole) und Schmierinfektionen. Verschiedene Arten gehaltener Tiere sind empfänglich für eine Infektion mit SARS-CoV-2. Dabei sind Katzen, Hunde, Frettchen und Goldhamster empfänglich für SARS-CoV-2. Schweine, Hühner und Enten sind dagegen nicht empfänglich.

Bei SARS-CoV-2 handelt es sich um ein behülltes Virus mit einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität.

1.2 Klinische Symptomatik

Die Ausprägung klinischer Symptome bei infizierten Tieren reicht vom asymptomatischen Verlauf bis zu schweren Atemwegserkrankungen und Durchfall. Die gegenwärtigen Erkenntnisse zu SARS-CoV-2 zeigen, dass die Empfänglichkeit verschiedener Tierarten sehr unterschiedlich ist.

1.3 Differentialdiagnose

Alle mit respiratorischen Symptomen und/oder Durchfall einhergehenden Erkrankungen, wobei bei der differentialdiagnostischen Abklärung epidemiologische Zusammenhänge mitberücksichtigt werden müssen.

1.4 Diagnostische Indikation

Epidemiologischer Zusammenhang mit einer labor diagnostisch bestätigten SARS-CoV-2-Infektion oder mit einem Verdacht auf eine SARS-CoV-2-Infektion oder mit einem COVID-19-Ausbruch bei Mensch oder Tier.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungseinrichtungen in den Ländern
- Nationales Referenzlabor (NRL) für SARS-CoV-2 bei gehaltenen Tieren am Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 0383517-0

SARS-CoV-2 Infektion bei gehaltenen Tieren

1.6 Rechtsgrundlagen

- Dritte Verordnung zur Änderung der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 8. Juli 2020,
- Verordnung über meldepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Vorsichtsmaßnahmen

Da es sich bei SARS-CoV-2 um einen humanpathogenen Erreger handelt, ist während der Probenahme und der Bearbeitung der Proben bei Verdacht auf SARS-CoV-2 für den Probenehmer entsprechende Schutzausrüstung notwendig.

2.2 Probenmaterial

Für die virologische Untersuchung

Oro- oder nasopharyngeale Tupferproben oder, wenn dies nicht möglich ist, Kotproben.

Für die serologische Untersuchung

Nativblutprobe oder Serum

2.3 Zeitpunkt der Probenahme

Bei Auftreten von respiratorischer Symptomatik bis zum Abklingen: Tupferproben aus dem Nasopharynx oder dem hinteren Rachenraum bzw. Kotproben.

Ab einer Woche nach Auftreten von Symptomen: Blutproben (zunächst für einen Nachweis von IgM)

2.4 Probenversand

Beim Versand der Proben sind die Transportvorschriften für biologische Stoffe der Kategorie B (UN3373) zu beachten. Tupferproben sollten in Virustransportmedium oder einer vergleichbaren Flüssigkeit versendet werden. Tupfer in einer Gelmatrix sollen nicht verwendet werden.

Blut- und Organproben sollten gekühlt oder gefroren versendet werden.

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)
- Bemerkungen und weitere Hinweise auf eine mögliche Erregereinschleppung.

3. Untersuchungsgang

3.1 Virusnachweis

Der Nachweis von SARS-CoV-2-spezifischen Nukleinsäureabschnitten erfolgt mittels RT-qPCR mit spezifischen Primer/Sonden-Kombinationen. Bei Ct-Werten >35 ist möglicherweise die detektierte Viruslast sehr gering. Es besteht zudem die Gefahr falsch positiver Nachweise durch schwach kontaminierte Reagenzien und unspezifischer Reaktionen. Wird daher bei der ersten (Screening-) RT-qPCR ein Ct-Wert >35 ermittelt, erfolgt eine Bestätigung dieses positiven Befundes mit mindestens einer zweiten (Bestätigungs-) RT-qPCR, deren Zielsequenz sich in einem anderen Bereich des viralen Genoms befindet. Als RT-qPCR wird eine Kombination aus der von Corman *et al.* 2020 beschriebenen E_Sarbeco RT-qPCR mit der Zielsequenz im E-Protein-Gen und der vom Institut Pasteur entwickelten IP4 RT-qPCR mit einer Zielsequenz im Gen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) empfohlen. Die Verwendung von kommerziell erhältlichen RT-qPCR Kits ist ebenfalls möglich.

Der Virusnachweis lässt sich in gepoolten Proben mit einer Poolgröße von bis zu fünf Einzelproben bei nur sehr geringen Sensitivitätseinbußen gut durchführen (Wernike *et al.* 2020; Abdalhamid *et al.* 2020). Dieses Vorgehen wird daher bei sehr großen Probenmengen und zu erwartender geringer Prävalenz empfohlen. Positive Poolproben müssen auf Einzelprobenbasis bestätigt werden. Hierdurch wird auch die Gefahr der Detektion falsch positiver Proben verringert.

3.1.1 RT-qPCR zum Nachweis des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2

3.1.1.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung viraler RNA eignen sich kommerziell erhältliche Kits für die manuelle oder automatisierte Extraktion gemäß den entsprechenden Herstellervorschriften. Zum Nachweis der erfolgreichen RNA-Isolierung kann vor der Isolierung eine heterologe RNA-Isolierungskontrolle (IC2, MS2 oder Ähnliches) zugesetzt werden. Im empfohlenen Standardprotokoll der beiden nachfolgend beschriebenen in-house RT-PCR-Verfahren dient jedoch das Housekeeping-Gen beta-Aktin als Kontrolle für a) einen erfolgreichen Abstrich, b) eine erfolgreiche RNA-Isolierung und c) eine erfolgreich durchgeführte RT-qPCR-Amplifikation.

3.1.1.2 RT-qPCR zum Nachweis des E-Gens

Der Nachweis SARS-CoV-2-spezifischer Nukleinsäuren im E-Gen erfolgt mittels Primer/Sonden, die von der Charité empfohlen werden (Corman *et al.* 2020):

Empfohlene Primer:

E_Sarbeco_F1: 5'–ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT–3' (Forward)

SARS-CoV-2 Infektion bei gehaltenen Tieren

E_Sarbeco_R2: 5'-ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A-3' (Reverse)

Empfohlene Sonde:

E_Sarbeco_P1: 5'-FAM-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-BBQ-3'

Die empfohlene Primer/Sonden-Kombination weist einen Abschnitt innerhalb der für das E-Protein codierenden RNA nach: Nukleotide 26269 - 26381 der als Referenzsequenz genutzten genomischen Sequenz des Virus „Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1“ mit der Genbank-Nummer MN908947.3 (Wu *et al.* 2020). Zur Überprüfung einer erfolgreichen RNA-Extraktion kann vor der Extraktion heterologe Kontroll-RNA (z. B. IC2-RNA (Hoffmann *et al.* 2006) oder MS2-RNA (Ninove *et al.* 2011)) zugegeben werden¹, routinemäßig wird jedoch das Housekeeping-Gen beta-Aktin in den jeweiligen Ansätzen mit Hilfe spezifischer Primer nachgewiesen.

Die hierfür verwendeten Primer und Sonden (Toussaint *et al.* 2007) sind:

Bezeichnung	Sequenz	Lokalisation (AY141970)
ACT-1005-F	5'-CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C-3'	1005 - 1029
ACT-1135-R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T-3'	1114 - 1135
ACT-1081-HEX	5'-HEX-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-BHQ1-3'	1081 - 1105

Der Aktin-Nachweis dient der Bestätigung eines erfolgten Abstrichs und der erfolgreichen RNA-Isolierung. Alternativ zu dem hier angegebenen β -Aktin-Mix2-HEX kann auch der unten beschriebene β -Aktin-Mix4-HEX auf die gleiche Weise und ohne Einschränkung verwendet werden.

Zur erleichterten Herstellung des Mastermix werden Vormischungen der spezifischen Primer/Sonden-Kombinationen hergestellt (Ausgangskonzentration der Primer/Sonden: 100 μ M):

E_Sarbeco-Mix-FAM:

10,0 μ l	E_Sarbeco_F1
10,0 μ l	E_Sarbeco_R2
5,0 μ l	E_Sarbeco_P1
175,0 μ l	0,1 x TE (pH 8,0)
200 μ l	Primer/Sonden-Mix

β -Aktin-Mix2-HEX:

5,0 μ l	ACT-1005-F
5,0 μ l	ACT-1135-R
5,0 μ l	ACT-1081-HEX
185,0 μ l	0,1 x TE (pH 8,0)
200 μ l	Primer/Sonden-Mix

β -Aktin-Mix4-HEX

5,0 μ l	ACT-1030-F
5,0 μ l	ACT-1135-R
5,0 μ l	ACT-1081-HEX
185,0 μ l	0,1 x TE (pH 8,0)
200 μ l	Primer/Sonden-Mix

¹ Sequenzen für Primer und Sonden zum Nachweis von IC2 bzw. MS2 sind nicht Teil der Methodensammlung.

Empfohlener Mastermix (pro Ansatz):

Amplifikations-Kit: SuperScript III One Step RT-PCR Kit with Platinum Taq- Polymerase	Ansatz mit Primern für beta-Aktin als Extraktionskontrolle und Referenz
RNase freies Wasser	2,1 µl
50 mM MgSO ₄	0,4 µl
2x Reaktions-Mix	12,5 µl
E_Sarbeco-Mix-FAM	2,0 µl
B-Actin-Mix2-HEX	2,0 µl
SuperScript III /Platinum Taq-Mix	1,0 µl

20,0 µl

5,0 µl

vorlegen in Reaktionsgefäß, anschließend
RNA Template zugeben

Das verwendete Temperaturprofil der RT-qPCR weicht nach Optimierungsschritten von dem in der Publikation empfohlenen Profil für den LightCycler ab:

45 °C 10 Min.

94 °C 5 Min.

42 Zyklen:

94 °C 15 Sek.

57 °C 20 Sek

72 °C 30 Sek. (Fluoreszenzmessung)

Bei jedem Lauf werden mindestens die folgenden Kontrollen mitgeführt (Positivkontrolle = isolierte RNA mit bekanntem Ct-Wert, Negativkontrolle = RNA-Isolierung aus Material, das keine SARS-CoV-2-spezifische RNA enthält, NTC = No template control = Puffer oder Wasser)

Beim Einsatz alternativer PCR-Reagenzien sind diese laborintern auf ihre Eignung zu prüfen.

3.1.1.3 RT-qPCR zum Nachweis des RdRp-Gens

Der Nachweis SARS-CoV-2-spezifischer Nukleinsäuren im RdRp-Gen erfolgt mittels Primer/Sonden, die das Institut Pasteur empfiehlt.

Empfohlene Primer:

SARS2-IP4-14059F: 5'–GGT AAC TGG TAT GAT TTC G -3' (Forward)

SARS2-IP4-14146R: 5'-CTG GTC AAG GTT AAT ATA GG -3' (Reverse)

Empfohlene Sonde:

SARS2-IP4-14084: FAM: 5'-FAM- TCA TAC AAA CCA CGC CAG G -BHQ-3'

Die Primer/Sonden-Kombination weist einen Abschnitt innerhalb der für das RdRp-Protein codierenden RNA nach: Nukleotide 14080 - 14186 der als Referenzsequenz genutzten genomischen Sequenz des Virus „Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1“ mit der

SARS-CoV-2 Infektion bei gehaltenen Tieren

Genbank-Nummer MN908947.3 (Wu *et al.* 2020). Zur Überprüfung einer erfolgreichen RNA-Extraktion kann vor der Extraktion heterologe Kontroll-RNA (z. B. IC2-RNA oder MS2-RNA) zugegeben werden², routinemäßig wird jedoch das Housekeeping-Gen beta-Aktin in den jeweiligen Ansätzen mit Hilfe spezifischer Primer (Wernike *et al.* 2012) nachgewiesen. Die hierfür verwendeten Primer und Sonde sind:

Bezeichnung	Sequenz	Lokalisation (AY141970)
ACT-1030-F	5'-AGC GCA AGT ACT CCG TGT G -3'	1030 - 1047
ACT-1135-R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T-3'	1114 - 1135
ACT-1081-HEX	5'-HEX-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-BHQ1-3'	1081 - 1105

Der Aktin-Nachweis mit dem Vorwärtsprimer ACT-1030-F weist neben genomischer DNA auch RNA nach und dient der Bestätigung eines erfolgten Abstrichs sowie der erfolgreichen RNA-Isolierung.

Zur erleichterten Herstellung des Mastermix werden Vormischungen der spezifischen Primer/Sonden-Kombinationen hergestellt (Ausgangskonzentration der Primer/Sonden: 100 µM):

SARS-2-IP4-Mix-FAM:

15,0 µl	SARS2-IP4-14059F
15,0 µl	SARS2-IP4-14146R
5,0 µl	SARS2-IP4-14084
165,0 µl	0,1 x TE (pH 8,0)
200 µl	Primer/Sonden-Mix

β-Aktin-Mix4-HEX:

5,0 µl	ACT-1030-F
5,0 µl	ACT-1135-R
5,0 µl	ACT-1081-HEX
185,0 µl	0,1 x TE (pH 8,0)
200 µl	Primer/Sonden-Mix

² Sequenzen für Primer und Sonden zum Nachweis von IC2 bzw. MS2 sind nicht Teil dieser Arbeitsanweisung.

Empfohlener Mastermix (pro Ansatz):

Amplifikations-Kit: AgPath-ID™ One-Step RT-qPCR Reagents	Ansatz mit Primern für beta-Aktin als Extraktionskontrolle und Referenz
RNase free water	1,25 µl
2x RT-PCR buffer	6,25 µl
25x RT-PCR enzyme mix	0,5 µl
SARS-2-IP4-Mix-FAM	1,0 µl
B-Actin-Mix4-HEX	1,0 µl

10,0 µl

vorlegen in Reaktionsgefäß,
anschließend

2,5 µl

RNA Template zugeben

Für diese RT-qPCR wird das folgende Temperaturprofil verwendet:

45 °C 10 Min.

95 °C 10 Min.

42 Zyklen:

95 °C 15 Sek.

57 °C 20 Sek.

72 °C 30 Sek. (Fluoreszenzmessung)

Bei jedem Lauf werden mindestens die folgenden Kontrollen mitgeführt (Positivkontrolle = isolierte RNA mit bekanntem Ct-Wert, Negativkontrolle = RNA-Isolierung aus Material, das keine SARS-CoV-2-spezifische RNA enthält, NTC = No template control = Puffer oder Wasser)

Beim Einsatz alternativer PCR-Reagenzien sind diese laborintern auf ihre Eignung zu prüfen.

3.1.1.4 Auswertung der PCRs

Zur Auswertung der PCRs wird der Ct-Wert der Amplifikation des Kontrollgens (sofern im Reaktionsansatz vorhanden) sowie der SARS-CoV-2-spezifischen Amplifikation bestimmt. Diese Bestimmung erfolgt je nach Auswertesoftware durch einen automatischen Algorithmus oder einen definierbaren Schwellenwert:

- NTC und Negativkontrolle dürfen keinen Ct-Wert aufweisen.
- Die Positivkontrolle liegt im definierten Ct-Wertbereich.
- Für alle Feldproben sollte die interne Kontrolle (heterolog oder beta-Aktin-basiert) nachweisbar sein. Ist kein Ct-Wert für die interne Kontrolle feststellbar und gleichzeitig auch keine SARS-CoV-2-spezifische Amplifizierung aufgetreten, ist die RT-qPCR nicht auswertbar und somit die RNA-Isolierung und/oder die RT-PCR zu wiederholen.

SARS-CoV-2 Infektion bei gehaltenen Tieren

Liegen die Ct-Werte der Kontrollen in den angegebenen Bereichen, ist die RT-qPCR auswertbar. Wurde bei der RT-qPCR eine Standardverdünnungsreihe mit bekannter Kopienzahl mitgeführt, so kann mittels dieser Standardgerade die Kopienzahl der RNA in der Ursprungs-RNA-Suspension bestimmt werden.

Die Anzucht von Virus aus Probenmaterial mit anschließender Sequenzierung ist ebenfalls eine geeignete Methode eine Infektion mit SARS-CoV-2 nachzuweisen. Der Anzuchtversuch sowie die Isolierung des Virus müssen dabei unter der biologischen Schutzstufe 3 durchgeführt werden. Es ist weiterhin zu beachten, dass die Anzucht bei niedrig belasteten Proben meist nicht möglich ist.

3.2 Antikörpernachweis

Der Nachweis spezifischer Antikörper gegen das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 kann durch zugelassene ELISA oder Point of Care-Testsysteme gemäß den Herstelleranweisungen erfolgen. Die Bestätigung erfolgt durch den Serumneutralisationstest (z. B. SNT, PRNT).

3.3 Literatur:

- Abdalhamid, B., C. R. Bilder, E. L. McCutchen, S. H. Hinrichs, S. A. Koepsell and P. C. Iwen (2020). "Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing Resources." American Journal of Clinical Pathology 153(6): 715-718.
- Corman, V. M., O. Landt, M. Kaiser, R. Molenkamp, A. Meijer, D. K. W. Chu, T. Bleicker, S. Brunink, J. Schneider, M. L. Schmidt, D. Mulders, B. L. Haagmans, B. van der Veer, S. van den Brink, L. Wijsman, G. Goderski, J. L. Romette, J. Ellis, M. Zambon, M. Peiris, H. Goossens, C. Reusken, M. P. G. Koopmans and C. Drosten (2020). "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR." Euro Surveill 25(3).
- Hoffmann, B., K. Depner, H. Schirrmeier and M. Beer (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(1-2): 200-209.
- Ninove, L., A. Nougairede, C. Gazin, L. Thirion, I. Delogu, C. Zandotti, R. N. Charrel and X. De Lamballerie (2011). "RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests." PLoS One 6(2): e16142.
- Tan, C.W., W.N. Chia, M. I-C. Chen et al. (2020). "A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (sVNT) based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike (RBD) protein-protein interaction", PREPRINT (Version 1) available at Research Square. doi.org/10.21203/rs.3.rs-24574/v1
- Toussaint, J. F., C. Sailleau, E. Breard, S. Zientara and K. De Clercq (2007). "Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments." J Virol Methods 140(1-2): 115-123.
- Wernike, K., B. Hoffmann, D. Kalthoff, P. König and M. Beer (2011). "Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1." J Virol Methods 174(1-2): 77-84.
- Wu, F., S. Zhao, B. Yu, Y.-M. Chen, W. Wang, Z.-G. Song, Y. Hu, Z.-W. Tao, J.-H. Tian, Y.-Y. Pei, M.-L. Yuan, Y.-L. Zhang, F.-H. Dai, Y. Liu, Q.-M. Wang, J.-J. Zheng, L. Xu, E. C. Holmes and Y.-Z. Zhang (2020). "A new coronavirus associated with human respiratory disease in China." Nature.

Falldefinition - SARS-CoV-2-Infektion

Klinisches Bild

Die Ausprägung klinischer Symptome bei infizierten Tieren reicht vom asymptomatischen Verlauf bis zu schweren Atemwegserkrankungen und Durchfall. Die gegenwärtigen Erkenntnisse zu SARS-CoV-2 zeigen, dass die Empfänglichkeit verschiedener Tierarten sehr unterschiedlich ist.

Differentialdiagnose

Erkrankungen mit respiratorischer Symptomatik und Durchfall.

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Genomnachweis mittels RT-qPCR
- Virusisolierung

Für den Erregernachweis eignen sich Abstriche von der Rachen- und Nasenschleimhaut oder, falls diese nicht genommen werden können, Kotproben.

Indirekter Nachweis:

- spezifische Neutralisation durch Antikörper (SNT)
- Enzymimmuntests (ELISAs, LFDs)

Die Bestätigung von SARS-CoV-2-Fällen bei Tieren erfolgt am FLI.

Epidemiologischer Zusammenhang

Epidemiologischer Zusammenhang mit einer labordiagnostisch bestätigten SARS-CoV-2-Infektion oder mit einem Verdacht auf eine SARS-CoV-2-Infektion oder mit einem COVID-19-Ausbruch bei Mensch oder Tier.

Zusatzinformation

Verdachtsproben sollten unter entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen (inkl. persönlicher Schutzausrüstung) behandelt werden. Für den Versand von Probenmaterial sind die einschlägigen Vorschriften zu beachten.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung einer SARS-CoV-2-Infektion oder eines Ausbruchs:

- Nachweis von Virus oder viralem Genom bei einem Tier
- Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen SARS-CoV-2

Rechtsvorschriften

- Dritte Verordnung zur Änderung der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 8. Juli 2020
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils geltenden Fassung