

Methode und Falldefinition

Infektionen mit Henipaviren (*Hendra-Virus* und *Nipah-Virus*)

Inhaltsverzeichnis

Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Mögliche Differentialdiagnosen	3
1.4 Diagnostische Indikation	3
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.6 Rechtsgrundlagen.....	4
2. Untersuchungsmaterial	4
3. Untersuchungsgang	6
3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR	6
3.2 Nachweis Henipavirus-spezifischer Antikörper	6
Falldefinition - Nipah-/Hendra-Virusinfektion	7

Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die beiden eng verwandten Erreger gehören zur Gattung *Henipavirus* aus der Familie der *Paramyxoviridae*. Infektionen mit dem Hendra-Virus bei Pferden wurden erstmals 1994 in Australien in der Nähe von Brisbane diagnostiziert. Infektionen mit dem Nipah-Virus wurden erstmals 1998 bei Schweinen in Malaysia identifiziert, später wurden auch Fälle in Bangladesch und Indien bekannt. Beide Erreger können beim Menschen letale Infektionen (Enzephalitiden) auslösen und wurden der Risikostufe 4 zugeordnet. In Europa wurden die Erreger bisher nicht nachgewiesen.

1.2 Klinische Symptomatik

Nipah-Virus-Infektionen beim Schwein äußern sich durch eine fieberhafte Atemwegserkrankung, verbunden mit einem charakteristischen, bellenden Husten "One-mile cough". Einige Tiere entwickeln zentralnervöse Störungen, die bei Sauen und Ebern zu plötzlichen Todesfällen führen können. Die Morbidität beträgt bis zu 100 %, die Mortalität liegt meist bei 1 bis 3 %. Postmortale Veränderungen finden sich primär in der Lunge, seltener im ZNS.

Pferde entwickeln nach der Infektion mit Hendra-Viren ebenfalls starke respiratorische Symptome mit rasanter Krankheitsentwicklung mit hohem Fieber, hochgradiger Pleuropneumonie und/oder Enzephalitis mit hoher Mortalität.

Beide Erreger sind zoonotische Erreger der Risikostufe 4 und auf den Menschen übertragbar. Hier kommt es ebenfalls zur fieberhaften Erkrankung, die zu Beginn mit respiratorischen Symptomen einhergehen kann. Im weiteren Verlauf entwickeln sich Kopfschmerzen, Benommenheit und unklare Sprache bis hin zu Ohnmacht und Koma. Die Mortalität beim Menschen kann **100 > 75 %** erreichen. Als Komplikation kann es noch Jahre nach überstandener Nipah-Infektion zur Rekurrenz kommen, die meist mit schwereren Verläufen einhergeht.

1.3 Mögliche Differenzialdiagnosen

Schwein: Aujeszky'sche Krankheit, Klassische Schweinepest (KSP), Afrikanische Schweinepest (ASP)

Pferd: Afrikanische Pferdepest (AHS), Intoxikation (Anthrax, Botulismus), Equine Infektiöse Anämie (EIA), Equine Virus Arteritis (EVA).

1.4 Diagnostische Indikation

Beim Import aus, oder Export in Länder bzw. Regionen, in denen Henipavirus-Infektionen nachweislich vorkommen, können molekulare und/oder serologische Import- oder Exportuntersuchungen verlangt werden.

Infektionen mit Henipaviren (Hendra-Virus und Nipah-Virus)

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Nationales Referenzlabor (NRL) für Henipavirus-Infektionen bei Tieren am Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 0383517-0.

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz, TierGesG) in der aktuell gültigen Fassung

2. Untersuchungsmaterial

Da es sich bei Henipaviren um zoonotische Viren der Risikostufe 4 handelt, ist bei der Probenahme bei infektionsverdächtigen Tieren unbedingt persönliche Schutzausrüstung zu tragen, die mindestens aus einem flüssigkeitsdichten Overall, zwei Paar Einweg-Handschuhen, Spritzvisier bzw. Schutzbrille und einer geeigneten Maske, bei Sektionen ggf. Respiratorhelm, besteht. Auf Hygienemaßnahmen zur Vermeidung der Verschleppung des Erregers ist strikt zu achten.

Bei einem Verdacht auf eine Henipavirus-Infektion sind einzusenden:

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

Wenn nach Sektion eines verdächtigen Tieres Organmaterial zur Verfügung steht, sind zusätzlich einzusenden:

- Milz
- Niere
- Lunge
- Gehirn

Zu den Organproben ist ein Vorbericht über das Tier (Klinik, Pathologie) zu übermitteln.

Hinweis: Empfohlen werden wassergefüllte Kühllakkus, die zu einer Temperatur von etwas über 0 °C führen; CO₂-Trockeneis ist nicht zu verwenden.

Infektionen mit Henipaviren (Hendra-Virus und Nipah-Virus)

Beförderung von Probenmaterial (Inland)

Für die gefahrgutrechtliche Klassifizierung von Probenmaterial ist der Absender verantwortlich.

Für den Versand von Henipavirus-Verdachtsproben ist ein Transport nach Maßgabe der „Guidelines for the Safe Transport of Infectious Substances and Diagnostics Specimen“ der WHO für den „Local Surface Transport“ empfohlen. Solche Proben gelten nicht als Gefahrgut und werden nach der ADR 2005 als ansteckungsgefährliche Stoffe der Gefahrenklasse 6.2 in die Kategorie B, „UN 3373 Diagnostische Proben“ eingeordnet. Dieses Transportgut unterliegt in der Gefahrgut-VO jedoch keinen weiteren Reglementierungen. Die Proben müssen in verschließbaren Kunststoffröhrchen und diese in verschließbaren, beschrifteten Kunststoffboxen transportiert werden, die in den Transportfahrzeugen stoßfest zu sichern sind.

Auszüge aus der hierzu relevanten Verpackungsvorschrift P650:

Die Proben müssen in Verpackungen von guter Qualität verpackt werden, die stark genug sind, um den normalerweise während der Beförderung einschließlich Umladen zwischen Fahrzeugen und/oder Warenlagern sowie Entnehmen von einer Palette oder aus einer Umverpackung zur weiteren manuellen oder mechanischen Behandlung auftretenden Stößen und Belastungen standzuhalten. Die Verpackungen müssen so gebaut und verschlossen werden, dass ein Austreten des Inhalts aus der versandfertigen Verpackung, was unter den normalen Bedingungen des Transports, durch Erschütterungen oder durch Temperatur-, Feuchtigkeits- oder Druckänderungen verursacht werden kann, verhindert wird.

Die Gefäße als erste Verpackungen müssen in die zweite Verpackung so eingesetzt werden, dass sie unter normalen Beförderungsbedingungen nicht zerbrechen oder durchstoßen werden können, und dass ihr Inhalt nicht in die zweite Verpackung austreten kann. Zweite Verpackungen müssen durch geeignete Polstermittel in Außenverpackungen gesichert werden. Die Schutzeigenschaften der Polstermittel oder der Außenverpackungen dürfen durch austretenden Inhalt nicht wesentlich beeinträchtigt werden.

Die Verpackung muss aus drei Bestandteilen bestehen: Primärgefäß, Sekundärgefäß und Außenverpackung. Die ersten Gefäße müssen wasserdicht sein. Jedes Versandstück muss klar und deutlich mit der Aufschrift UN 3373 „Diagnostische Proben“ gekennzeichnet sein.

Wenn mehrere zerbrechliche Gefäße in eine einzelne zweite Verpackung eingesetzt werden, müssen sie entweder einzeln eingewickelt oder so voneinander getrennt werden, dass eine gegenseitige Berührung verhindert wird.

Eine Zertifizierung der Verpackung ist nicht erforderlich.

Die Probenverpackung muss äußerlich gut desinfiziert werden (z. B. mit einem alkoholischen Desinfektionsmittel). 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. Viele Nachweisverfahren sind mit gewissen Einschränkungen auch bei gefrorenen Proben anwendbar).

Proben sind nach Möglichkeit per Kurier zum Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems zu schicken. Sie sind in jedem Fall telefonisch anzukündigen (0383517-0).

Infektionen mit Henipaviren (Hendra-Virus und Nipah-Virus)

3. Untersuchungsgang

(NUR DURCH das NRL am FLI DURCHZUFÜHREN)

3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR

Die Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (real-time RT-PCR) dient dem Nachweis von Virusgenom in Blut, Gewebe- oder Organproben. Kleine Fragmente viraler RNA werden in DNA-Fragmente transkribiert, die sich durch die PCR zu nachweisbaren Mengen amplifizieren. Da sich mit diesem Test nur eine Genomsequenz des Nipah-/Hendra-Virus nachweisen lässt, kann die RT-PCR auch einen Positivbefund ergeben, wenn kein lebensfähiger Infektionserreger mehr vorhanden ist (z. B. in autolytischen Geweben oder Proben von rekonvaleszenten Tieren).

Die Durchführung der real-time PCR erfolgt nach dem von der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) empfohlenen Protokoll (Mungall *et al.*, 2006). ~~und nach einem zweiten publizierten~~ Im Falle eines positiven Ergebnisses wird die Probe mit Hilfe einer weiteren real-time-RT-PCR Protokoll (Feldmann *et al.*, 2009) untersucht. ~~Dabei~~ In beiden Fällen wird ein Amplifikationsprodukt im Genbereich des Nukleoproteins des Nipah- oder Hendra-Virusgenoms erzeugt.

3.2 Nachweis Henipavirus-spezifischer Antikörper

Für die serologische Diagnostik von Infektionen mit Henipaviren wurden am Friedrich-Loeffler-Institut verschiedene ELISA-Systeme entwickelt, ~~welche sich derzeit in der Validierung befinden~~. Eines basiert auf dem Nukleoprotein des Hendra-Virus, zeigt aber eine sehr gute Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen das Nipah-Virus. Weitere ELISA-Systeme basieren auf dem jeweiligen Glykoprotein. Diese Testsysteme sind zur Untersuchung von Pferde- und Schweineseren, ~~sowie weiterer Spezies (z.B. Flughunde)~~, geeignet. Die Kombination der serologischen Untersuchung von Pferden auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Nukleoprotein und das Glykoprotein des Hendra-Virus kann zur Unterscheidung geimpfter und infizierter Pferde eingesetzt werden. Der einzige, nur in Australien zugelassene Impfstoff basiert auf dem rekombinant exprimierten Glykoprotein des Hendra-Virus. Daher enthalten Seren geimpfter Pferde nur Antikörper gegen das Glykoprotein, während Seren infizierter Pferde Antikörper gegen das Glykoprotein und das Nukleoprotein des Hendra-Virus enthalten.

Falldefinition - Nipah-/Hendra-Virusinfektion

Klinisches Bild

Nipah-Virusinfektion beim Schwein: fieberhafte Atemwegserkrankung mit angestrenzter Atmung und charakteristischem, bellenden Husten, selten ZNS-Erkrankung; Morbidität bis 100 %, Mortalität 1 - 3 %.

Hendra-Virusinfektion beim Pferd: hohes Fieber mit hochgradiger Pleuropneumonie und Enzephalitis, rasante Entwicklung, selten Übertragung von Pferd zu Pferd, Mortalität bei infizierten Pferden ca. 75 %.

Labordiagnostischer Nachweis

Diagnostische Untersuchungen sind nur durch das NRL am FLI durchzuführen.

1. Nukleinsäurenachweis (real-time PCR)

Zum Nachweis von Virusgenom in Blut, Gewebe- oder Organproben nach dem von der OIE empfohlenen Protokoll (Mungall *et al.*, 2006); **im positiven Fall und** nach einem zweiten publizierten Protokoll (Feldmann *et al.*, 2009) durch Amplifikation eines Genbereichs des Nukleoproteins des Nipah- oder Hendra-Virusgenoms.

2. Serologie

Am Friedrich-Loeffler-Institut wurden hierzu verschiedene ELISA-Systeme zur Untersuchung von Pferde- und Schweineseren entwickelt und validiert (ausgeprägte Kreuzreaktivität zwischen Hendra- und Nipah-Virus Antikörpern). Für die Untersuchung von Pferden wurde ein DIVA-Assay entwickelt.

Epidemiologischer Zusammenhang

Nipah- und Hendra-Viren kommen in Südostasien vor, darüber hinaus vermutlich apathogene Henipaviren in Afrika südlich der Sahara. Flughunde der Gattung Pteropus wurden als Reservoirwirte für Hendra- und Nipah-Viren identifiziert. Übertragung auf Schweine (Nipah-Virus, Malaysia) oder Pferde (Hendra-Virus, Australien) erfolgt durch indirekten Kontakt, meist über kontaminierte Früchte. Durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder deren Ausscheidungen bzw. Organen (Sektion) ist eine Übertragung dieser hochpathogenen Erreger auf den Menschen möglich. **In Indien und Bangladesch kommt es dagegen regelmäßig über den Verzehr von kontaminierten Früchten oder Palmsäften zur Übertragung der Erreger von Flughunden auf Menschen.** Direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist selten, aber nicht ausgeschlossen. Infizierte Patienten entwickeln zunächst unspezifische Symptome einer fieberhaften Infektion, die sich innerhalb weniger Tage zu einer schweren Pneumonie oder Enzephalitis entwickeln kann.

Infektionen mit Henipaviren (Hendra-Virus und Nipah-Virus)

Voraussetzung für den Verdacht

Da Henipaviren und deren Reservoirwirte in Europa nicht vorkommen, kann ein begründeter Verdacht nur dann entstehen, wenn das betroffene Tier entweder aus Endemiegebieten importiert wurde, oder auf andere Weise ein direkter oder indirekter Kontakt zu infizierten Tieren bestanden hat.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Entfällt.

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz, TierGesG) in der aktuell gültigen Fassung