

Das interaktive Kalkulations- und Informationssystem InKalkTier kann somit für behördliche Entscheidungen integrativ als Beurteilungsgrundlage herangezogen und sowohl von Landwirt:innen als auch von landwirtschaftlichen Bildungs- und Beratungseinrichtungen genutzt werden.

Link zur Projektseite des KTBL:

<https://www.ktbl.de/themen/inkalktier>

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

InKalkTier-Team*

Janine Benthin, Anissa Dudde, Margret Wenker, E. Tobias Krause, Lars Schrader (FLI) und Lisa Brucker, Franziska Christ, Wilfried Hartmann, Sarah Kimmich, Monika Krause, Karsten Kühnbach, Anna Rauen, Stefanie Reith, Desiree Batzer-Kaufmann, Bastiaan Harmsen, Christian Mieland, Alon Richter, Kristoffer Schneider, Carole Urvoy (KTBL)

Der MKS-Ringtest 2021

Hanna Keck, Bernd Hoffmann und Michael Eschbaumer

FLI, Institut für Virusdiagnostik, Nationales Referenzlabor für Maul- und Klauenseuche



Hanna Keck
(© privat)

Insgesamt nahmen 23 Veterinäruntersuchungseinrichtungen der Länder am MKS-Ringtest 2021 des Nationalen Referenzlabors teil. Im Rahmen des Ringtests sollten 24 Proben blind mittels Real-Time RT-PCR auf MKSV-Genom untersucht werden. Dabei wurden teilweise auch mehrere Replikate einzelner Proben versandt, ohne diese entsprechend zu kennzeichnen. Als positives Material wurden inaktivierte Vollvirus-Impfstoffe verwendet.

Die Proben P01-P17 stammten aus einer Verdünnungsreihe einer O1 Manisa/O-3039 Vakzine. Für die negativen Proben P18-P21 wurde kommerzielles Kälberserum verwendet. P22-P24 enthielten einzelne Verdünnungen von Impfstoffen anderer Serotypen.

In weiteren 16 Proben waren Antikörper gegen MKSV nachzuweisen. Aus dem Serum eines mit MKSV O1 Manisa infizierten Rindes wurde eine Verdünnungsreihe (Proben E01-E10) hergestellt. Zusätzlich wurden drei weitere unverdünnte Seren (E14-E16) versandt, die ebenfalls in Tierversuchen am FLI gewonnen wurden. Für die negativen Proben E11-E13 wurde erneut kommerzielles Kälberserum eingesetzt. Keine der Proben enthielt vermehrungsfähiges MKS-Virus oder intaktes MKSV-Genom.

Zusätzlich zur Untersuchung der bereitgestellten Proben wurden die Laboratorien gebeten, die Anzahl der virologischen und serologischen MKS-Ausschlussuntersuchungen für jedes der vorangegangenen vier Jahre (2017-2020) anzugeben und kurz die Bedingungen zu beschreiben, unter denen in der Einrichtung MKS-Ausschlussuntersuchungen durchgeführt werden. Um die diagnostische Spezifität der ELISA-Kits in der deutschen MKS-Diagnostikabank zu überprüfen, wurden die Laboratorien darüber hinaus gebeten, die verbleibenden Reaktionen aus den für den Ringtest zur Verfügung gestellten Testkits zu verwenden, um weitere Proben aus ihren Routineeinsendungen zu testen.

P-Nr.	Inhalt	P-Nr.	Inhalt	P-Nr.	Inhalt
P01	Vakzine O 1:100	P09	Vakzine O 1:10.000	P17	Vakzine O 1:1.000.000
P02	Vakzine O 1:100	P10	Vakzine O 1:100.000	P18	Neg. Kälberserum
P03	Vakzine O 1:100	P11	Vakzine O 1:100.000	P19	Neg. Kälberserum
P04	Vakzine O 1:1.000	P12	Vakzine O 1:100.000	P20	Neg. Kälberserum
P05	Vakzine O 1:1.000	P13	Vakzine O 1:100.000	P21	Neg. Kälberserum
P06	Vakzine O 1:1.000	P14	Vakzine O 1:1.000.000	P22	Vakzine SAT2
P07	Vakzine O 1:10.000	P15	Vakzine O 1:1.000.000	P23	Vakzine A Argentinien
P08	Vakzine O 1:10.000	P16	Vakzine O 1:1.000.000	P24	Vakzine A24 Cruzeiro

Tab. 1: Zusammenstellung des Probenpanels Virologie

E-Nr.	Inhalt	E-Nr.	Inhalt	E-Nr.	Inhalt
E01	Serum 1:2	E06	Serum 1:8	E11	Neg. Kälberserum
E02	Serum 1:2	E07	Serum 1:8	E12	Neg. Kälberserum
E03	Serum 1:4	E08	Serum 1:8	E13	Neg. Kälberserum
E04	Serum 1:4	E09	Serum 1:32	E14	Serum A22
E05	Serum 1:8	E10	Serum 1:32	E15	Serum A Iran 99
				E16	Serum SAT2

Tab. 2: Zusammenstellung des Probenpanels Serologie

PCR

Die RT-qPCR-Untersuchung auf MKSV-Genom wurde von allen 23 Teilnehmern durchgeführt. Verwendet wurden dabei 23-mal die 3D-OIE RT-qPCR (Callahan et al., 2002) und 12-mal zusätzlich die IRES1 RT-qPCR (Oem et al., 2005). Die negativen Proben wurden, bis auf je ein Replikat in einem Labor, von allen Teilnehmenden als negativ erkannt. Bei Verwendung der 3D-OIE-PCR wurden die Proben bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 von allen 23 Teilnehmenden richtig erkannt. In der nächsthöheren Verdünnungsstufe 1:100.000 konnten ebenfalls fast alle Labore alle Proben als positiv erkennen. Nur bei wenigen war dies nicht der Fall. Durch den vierfachen Probenansatz wurde diese Probengruppe im Mittel dennoch richtig erkannt. Uneinheitlicher wird das Bild in der nächsten Probengruppe, welche die Verdünnung 1:1.000.000 darstellt, dies war aber angesichts der hohen Verdünnung nicht anders zu erwarten. Dennoch konnten 60 Prozent der Teilnehmenden alle Proben dieser Gruppe positiv bewerten und nur von 16 Prozent wurde keine Probe als positiv erkannt. Bei den Proben außerhalb der Verdünnungsstufen zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Proben P23 und P24 konnten zuverlässig von allen Teilnehmenden detektiert werden. Obwohl P22 die Probe mit dem höchsten Ct-Wert des gesamten Ringversuchs darstellte, konnten dennoch 76 Prozent der Labore diese Probe als positiv erkennen.

Beim MKSV-Genomnachweis mit der IRES1-PCR zeigt sich ein ähnliches Bild, jedoch mit deutlich reduzierter Sensitivität, insbesondere in den höheren Verdünnungsstufen. Bis einschließlich 1:10.000 konnten aber auch hier alle Proben von allen Teilnehmenden zuverlässig detektiert werden. Ab der Verdünnungsstufe 1:100.000 konnten einzelne Labore teilweise keines der Replikate mehr korrekt bewerten. Bei der Verdünnungsstufe 1:1.000.000 wurden von 77 Prozent der Teilnehmenden keine, oder nur einzelne, Replikate überhaupt positiv bewertet. **Wir empfehlen, für die MKS-Diagnostik die 3D-OIE RT-qPCR zu verwenden.** Es ist nicht mehr zulässig, die IRES-PCR alleine im Routinebetrieb einzusetzen. Diese Methode wird weder von der OIE noch vom EU-Referenzlabor für MKS empfohlen und darf daher nur zusammen mit dem 3D-OIE-Assay als Bestätigungstest eingesetzt werden. Falls nur ein Verfahren eingesetzt werden kann, muss der 3D-OIE-PCR der Vorzug gegeben werden.

Serologie

Die Serologie zum Nachweis von MKSV-Nichtstrukturprotein-Antikörpern wurde von 19 Teilnehmenden durchgeführt. Dabei kam in allen Fällen der ID Screen FMD NSP ELISA zum Einsatz. Ein Labor verwendete darüber hinaus zusätzlich den PrioCHECK FMDV NS ELISA. Die positiven und negativen Proben konnten von allen Teilnehmenden und mit beiden Tests korrekt identifiziert werden.

Spezifität des MKSV NSP-Antikörper-ELISA

Elf der teilnehmenden Labore stellten ELISA-Daten für zusätzliche Proben aus ihrem Routinebestand zur Verfügung. Insgesamt wurden 2.040 Messungen eingereicht, von denen 2.028 negativ und 12 positiv waren. Die positiven Proben stammten von ausschließlich aus Deutschland stammenden Wildschweinen und Schafen und werden als falsch positiv angesehen, da die MKS in Deutschland seit 1988 nicht mehr aufgetreten ist. Somit wurde insgesamt eine Spezifität des ELISA von 99,41 Prozent berechnet.

Differenzialdiagnostik und MKS-Ausschluss

In 45 Prozent der am Ringtest teilnehmenden Untersuchungseinrichtungen werden MKS-Ausschlussuntersuchungen nur auf ausdrücklichen Wunsch des Einsenders durchgeführt. Die übrigen 55 Prozent veranlassen dies auch von sich aus, z. B. wenn der Vorbericht klinische Anzeichen enthält, die mit MKS in Einklang stehen. Von den Einsendungen für Ausschlussuntersuchungen kommen 44 Prozent von Amtstierärzten, 32 Prozent von praktizierenden Tierärzten und 24 Prozent von anderen Einrichtungen, wie Universitäten oder Grenzkontrollstellen an Flughäfen.

Test	Jahr	Probenanzahl
MKSV RT-qPCR	2017	607
MKSV RT-qPCR	2018	378
MKSV RT-qPCR	2019	385
MKSV RT-qPCR	2020	211
MKSV NSP Ak ELISA	2017	37
MKSV NSP Ak ELISA	2018	82
MKSV NSP Ak ELISA	2019	75
MKSV NSP Ak ELISA	2020	38

Tab. 3: MKS-Untersuchungen in den regionalen Laboren 2017-2020

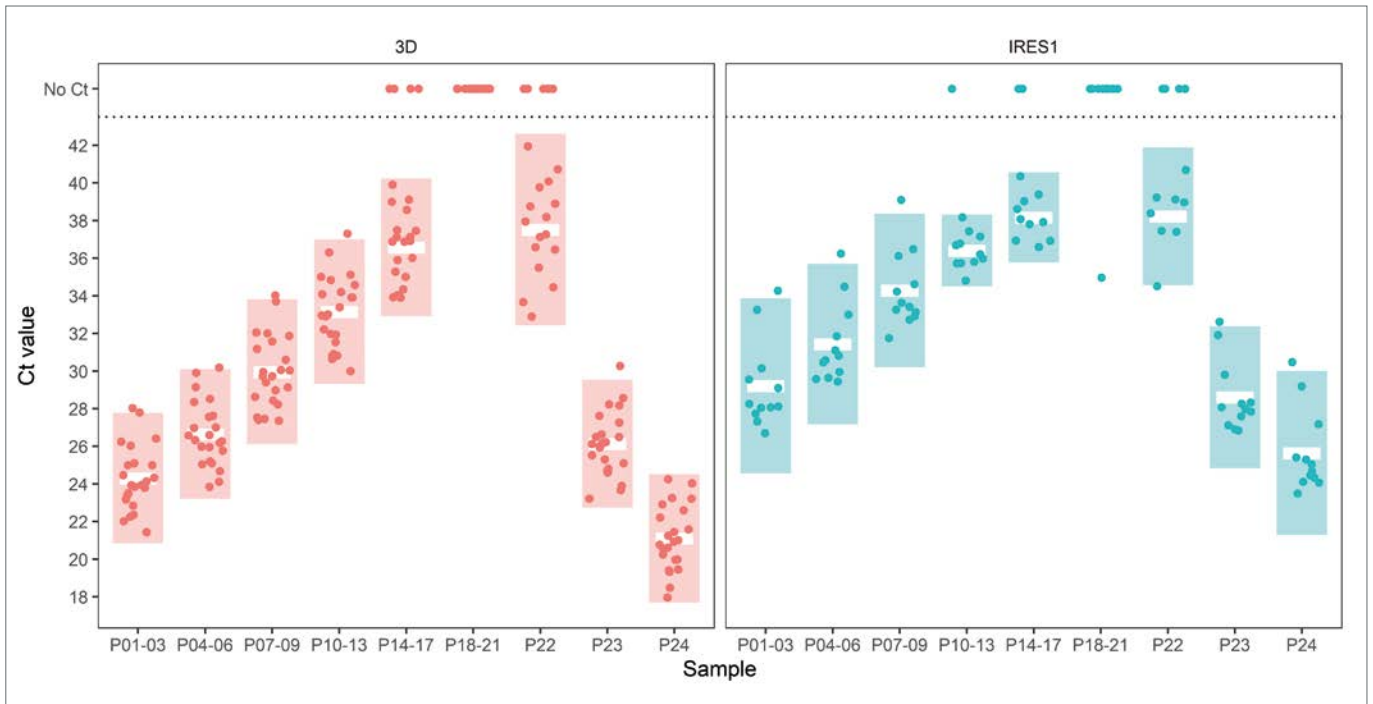


Abb. 1: RT-qPCR-Ergebnisse. Der Mittelwert aller Ergebnisse eines/einer Teilnehmenden für jede Probe bzw. Gruppe von Proben wird als ein gefüllter Kreis dargestellt. Der daraus errechnete Mittelwert aller Teilnehmenden wird durch einen weißen Balken markiert. Die farbigen Säulen geben die zweifache Standardabweichung dieses Mittelwerts an. (links, rot) 3D-OIE-PCR (rechts, blau) IRES1-PCR.

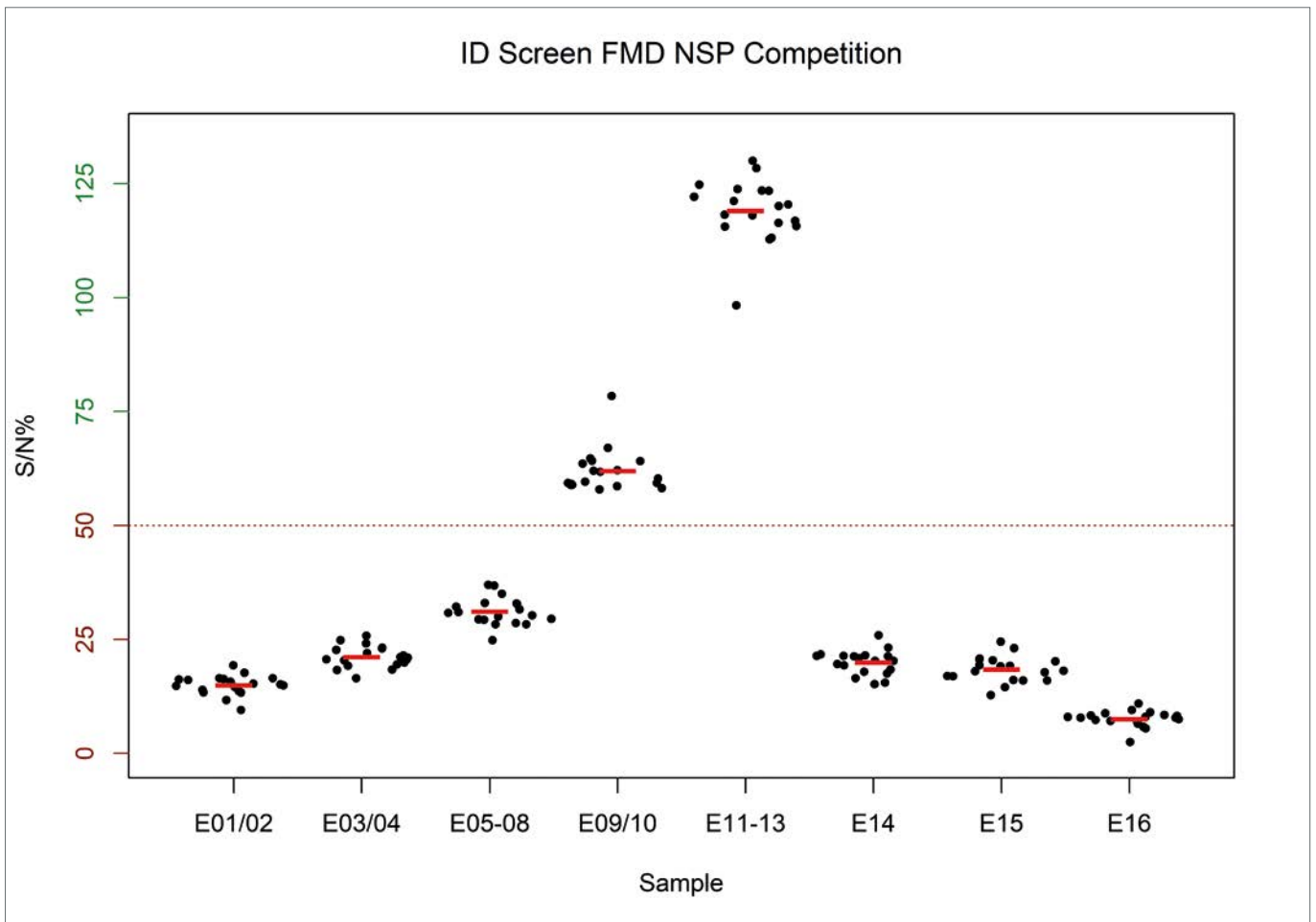


Abb. 2: Serologieergebnisse. Der Mittelwert aller Ergebnisse eines/einer Teilnehmenden für jede Probe bzw. Gruppe von Proben wird als ein gefüllter Kreis dargestellt. Der daraus errechnete Mittelwert aller Teilnehmenden wird durch einen roten Balken markiert. Proben mit einer optischen Dichte von 50 % oder weniger der optischen Dichte der Negativkontrolle ($S/N\% \leq 50$) gelten als positiv.

Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse zeigen erneut, dass **alle teilnehmenden Labore zur MKS-Diagnostik befähigt** sind, insbesondere für die differenzialdiagnostische Abklärung im Sinne der §2a MKSeuchV und §8 SchHaltHygV.

Stomatitiden und Klauenveränderungen kommen bei landwirtschaftlichen Nutztieren häufig vor. Ihre Ursachen lassen sich oft nicht eindeutig klären. Wo klinisch eine Abgrenzung zur MKS nicht sicher möglich ist, muss immer durch eine Laboruntersuchung das Vorliegen einer Infektion mit dem MKS-Virus ausgeschlossen werden.

Auch bei unklaren klinischen Befunden (Fieber, Schleimhautveränderungen, Lahmheit) bei Wiederkäuern und Schweinen ist die **MKS als Differenzialdiagnose** mit abzuklären. Der MKS-Ausschluss mittels RT-qPCR kann an den Untersuchungseinrichtungen der Länder jederzeit und problemlos durchgeführt werden. Vielerorts werden die Kosten für solche Ausschlussuntersuchungen auch durch die Tierseuchenkassen übernommen.

Um die MKS-Freiheit Deutschlands und Europas auch in Zukunft zu erhalten, ist eine aktive Beteiligung auf allen Ebenen – Tierhalter, Tierärzte, Untersuchungseinrichtungen und Veterinärbehörden – unverzichtbar.

KURZNACHRICHTEN

Für 2022/23 geplante Laborvergleichsuntersuchungen des Friedrich-Loeffler-Instituts

NRL	Methode	Prüfgegenstand	2022		2023		Ansprechpartner
			Q3	Q4	Q1	Q2	
Lungenseuche der Rinder	KBR	Serum		x			Dr. Martin Heller
ASP	ELISA, PCR	Serum, Lysate		x			PD Dr. Sandra Blome
Rauschbrand	Mikrobiologie: Kultur, Speziesidentifikation	Bakterienisolate				x	Dr. Christian Seyboldt
Brucellose	ELISA, KBR, RBT	Serum	x				Dr. Falk Melzer
TSE	ELISA	Gehirn (Rind, Schaf, Zervide)				x	Dr. Christine Fast
Beschälseuche	KBR	Serum	x				Dr. Gereon Schares
WNV	Molekularbiologie: PCR	RNA-Proben			x		Dr. Ute Ziegler
BVD/MD	RT-PCR, Antigen-ELISA, Virusisolierung, SNT, Antikörper-ELISA	Serum, Milch, Ohrstanzen				x	PD Dr. Kerstin Wernike
SBV	RT-PCR, SNT, Antikörper-ELISA	Serum				x	PD Dr. Kerstin Wernike
IHN, VHS, KHV, ISA	(RT)-(q)PCR, Zellkultur, Sequenzierung	erregerhaltiges Probenmaterial			x		PD Dr. U. Fischer, Dr. H. Schütze

Hinweise zum Auftreten neuer RHD-Varianten

Seit 2019 werden in kommerziellen Kaninchenhaltungen in Frankreich und Belgien veränderte hypervirulente RHDV2-Stämme nachgewiesen. Vor allem bei Jungtieren können diese trotz korrekter Impfung in seltenen Fällen zu dramatischen Verlusten führen. Nach bisherigen Erkenntnissen traten diese neuen hypervirulenten Stämme in Deutschland und in den Niederlanden noch nicht auf. Das Friedrich-Loeffler-Institut gibt einen Überblick der Lage sowie Hinweise zur Diagnostik und zu Impfungen, siehe https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00044097/FLI-Information_RHDV2_2022-01-14_K.pdf.



Abb.: Kaninchen (© FLI)