

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Federal Research Institute for Animal Health

# DER LABLOEFFLER NEWS für das LABOR

Heft 2 2022, Nr. 25



Liebe Kolleginnen und Kollegen,

auf stolze 40 Seiten bringt es die aktuelle Ausgabe des LabLoeffler, damit ist „Nummer 25“ unserer News für das Labor die bisher umfangreichste. Dies liegt unter anderem an den 10. Riemser Diagnostiktagen, die wir in diesem Jahr erfreulicherweise zumindest in Teilpräsenz durchführen können. Aus dem Programm unserer Fachtagung greifen wir drei spannende Themen auf: den Einsatz von Bakteriophagen gegen Antibiotikaresistenzen und den Einsatz von Sammel- und Tankmilch für die BVD Überwachung sowie die Auswirkungen der anscheinend enzootisch werdenden hochpathogenen aviären Inflenzaviren vom Subtyp H5.

Insgesamt spiegeln die Beiträge wie üblich die Bandbreite der Forschungsthemen und hoheitlichen Aufgaben des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) wider. Prominent vertreten ist erneut der „Dauerbrenner“ Geflügelpest, zu dem verschiedene Aspekte beleuchtet werden. So stellen wir seit kurzem Zeitreihenanalysen von Virusgenotypen über unsere Internetseite zur Verfügung, wie unsere wöchentlichen Fallkarten, zu finden über die Themenseite „Aviäre Influenza (AI)/Geflügelpest“.

Sollten Sie ein Thema vermissen, lassen Sie es die Redaktion bitte wissen – diese ist für Anregungen stets offen.

Wir wünschen eine kurzweilige Lektüre und freuen uns auf ein Treffen bei den Diagnostiktagen!

Mit kollegialen Grüßen



Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter



Prof. Dr. Martin Beer



## Inhalt

- 2 Vorwort
- 3 Inhaltsverzeichnis
- 4–6 Aktuelles zu Rustrelavirus-Infektionen bei Wild- und Zootieren im Nordosten Deutschlands
- 6–8 Serologisches Screening bei Wildwiederkäuern in Deutschland: Kein Hinweis auf das Vorkommen von SARS-CoV-2
- 9–11 Afrikanische Schweinepest – Genetische Varianten auf dem Vormarsch
- 12–14 Außerhalb des Riemser Zauns: Infektionserregern auf der Spur
- 15 Nationales Tierwohl-Monitoring
- 16–25 10. RIEMSER DIAGNOSTIKTAGE
- 26 Die HPAIV Genotypen in Deutschland: Immer neu und immer aktuell
- 27 COMPARE-Ringversuch für NGS-basierte Diagnostik von FFPE-Material
- 28–29 Auswertung des nationalen Ringtests zur Diagnostik von viralen Fischseuchen-Erregern
- 30–33 Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung Paratuberkulose 2021

## KURZNACHRICHTEN

- 34 Projekt Influenzaviren bei Schweinen
- 34 Silberner LabLoeffler
- 35 Für 2023 geplante Laborvergleichsuntersuchungen
- 35 Aus der Zulassungsstelle
- 36–38 Nationale Referenzlaboratorien

# Aktuelles zu Rustrelavirus-Infektionen bei Wild- und Zootieren im Nordosten Deutschlands

Angele Breithaupt und Dennis Rubbenstroth

FLI, Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit/Labor für Pathologie I, Institut für Virusdiagnostik/Labor für phylogenetische Analysen



Angele Breithaupt  
(© privat)

## Erstbeschreibung RusV-assoziierter Todesfälle bei Zootieren in Stralsund

Das Rustrelavirus (RusV; Spezies *Rubivirus strelense*), ein neu entdeckter Verwandter des Rötelnvirus (Rubellavirus, RuV; *Rubivirus rubellae*), wurde erstmals 2020 als ein tödlicher Krankheitserreger bei Zootieren in Stralsund, im Nordosten Deutschlands beschrieben (1).

Vor der Entdeckung des RusV und des verwandten Ruhuguvirus (RuhV; *Rubivirus ruteetense*) war das Rötelnvirus das einzige Mitglied der Gattung *Rubivirus*, Familie *Matonaviridae*. Das hochansteckende Rötelnvirus kommt weltweit, jedoch ausschließlich beim Menschen vor. RusV wurde initial post mortem im Hirngewebe von einem Esel (*Equus asinus*), einem Wasserschwein (*Hydrochoerus hydrochaeris*) und einem Bennett-Känguru (*Macropus rufogriseus*) entdeckt. Alle drei Zootiere zeigten schwere neurologische Krankheitsanzeichen (u. a. Ataxie, Krämpfe, Lethargie) und entwickelten eine nichteitrigige Meningoenzephalitis. Im Rahmen der Schadnagerbekämpfung im und um das Zoogelände konnte RusV außerdem im Hirngewebe von Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*), aber bei keinem anderen Kleinsäuger, identifiziert werden. Im Gegensatz zu den Zootieren lagen bei diesen Nagern keine Hinweise für eine Meningoenzephalitis vor (siehe auch LabLoeffler 21/2020).

## Weitere Fälle bei Zoo- und Wildtieren nun auch in Zoos bei Paaren und Perleberg

Seither wurde das RusV zunächst bei drei weiteren Fällen von tödlicher Meningoenzephalitis in Stralsund nachgewiesen: neben einem südamerikanischen Nasenbären (*Nasua nasua*) sowie einem zweiten Bennett-Känguru aus dem Zoo fand sich in unmittelbarer Nähe der Einrichtung ein europäischer Otter (*Lutra lutra*), der kurz nach Verbringung im Zoo verstarb (2). Beide Tiere zeigten abnorme Bewegungsabläufe, der Otter zusätzlich einen Verlust der natürlichen Scheu.

Darüber hinaus wurden Fälle von RusV-assoziierter Meningoenzephalitis erstmals auch in anderen Zoos in Nordostdeutschland entdeckt, in den Regionen Paaren und Perleberg in Brandenburg (3). In beiden Fällen handelt es sich wiederum um Bennett-Kängurus. Dank der engen Zusammenarbeit mit den Zoos, den zuständigen Landesuntersuchungseinrichtungen (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei M-V, LALLF; Landeslabor Berlin-Brandenburg, LLBB) bzw. der Tierpathologie der Freien Universität Berlin konnten weitere Details zur Verbreitung des Virus und zum Krankheitsverlauf insbesondere bei

Bennett-Kängurus beschrieben werden. Alle RusV-infizierten Bennett-Kängurus zeigten plötzliche Anzeichen einer therapieresistenten neurologischen Erkrankung mit einem breiten Spektrum neurologischer Krankheitsanzeichen, die vor allem den Bewegungsapparat betrafen. Daneben wurde auch Nasenausfluss dokumentiert. Bemerkenswert war, dass sowohl im Zoo bei Perleberg als auch bei Paaren bereits zuvor tödliche Krankheitsfälle bei je einem Känguru aufgetreten waren (2019 und 2020), die jedoch nicht ätiologisch abgeklärt wurden.

## Gesamtschau der bisherigen Befunde aus allen bislang veröffentlichten Studien

RusV-Genom wurde bei allen Fällen mittels spezifischer RT-qPCR im Gehirn nachgewiesen, während in anderen Geweben nur vereinzelt sehr geringe Mengen viraler RNA nachzuweisen waren. Durch RNA-in-situ-Hybridisierung (RNA-ISH) konnten Neuronen als hauptsächliche Zielzellen identifiziert werden. Die histopathologische Untersuchung zeigte in allen Fällen eine nichteitrigige Meningoenzephalitis mit perivaskulären und im Gewebe verteilten Immuneinfiltraten sowie wenigen Mikrogliaknötchen. Nur in Einzelfällen konnten in geringem Ausmaß neuronale Degenerationen und Nekrosen nachgewiesen werden und es lagen keine Hinweise für eine Entmarkung (Demyelinisierung) im Gehirn vor. Es konnten nur sehr wenige, aktive-Caspase 3 markierte, apoptotische Zellen intraläsional gefunden werden. In den entzündlichen Infiltraten dominierten CD3-positive T-Zellen, daneben fanden sich zahlreiche IBA1-positive Mikrogliazellen bzw. infiltrierende Makrophagen. Ferner zeigten GFAP-markierte Astrozyten bei einigen Tieren Anzeichen einer Aktivierung (plumpe Zellform). Zum Teil lagen Hinweise für intravitale Blutungen vor (positive Berliner Blau Reaktion), die möglicherweise auf stumpfe Traumata zurückzuführen sein könnten, etwa aufgrund unkoordinierter Bewegungen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (siehe Abb. 1 und Abb. 2). Bemerkenswerterweise bestand zum Teil kein direkter räumlicher Zusammenhang zwischen dem Nachweis von RusV-RNA mittels RNA-ISH und der Entzündungsreaktion bzw. den Mikrogliaknötchen. So konnte in einigen Hirnarealen abundant virales Genom, jedoch keine offensichtliche Gewebsreaktion identifiziert werden.

Unklar bleibt, ob der teils schlechte Ernährungszustand einiger Tiere auf einen längeren Krankheitsverlauf hindeutet. Offensichtliche neurologische Anzeichen traten meist erst kurz vor der Euthanasie bzw. dem Tod auf.

Die Beschränkung der Läsionen und des Virusnachweises auf das Gehirn ist typisch für Spill-over-Wirte von Neuropathogenen wie z. B. auch dem Borna disease virus 1 (BoDV-1), dem Erreger der Bornaschen Krankheit. Bei den infizierten und erkrankten Zoo- und Wildtieren handelt es sich vermutlich um Sackgassenwirte, die das Virus vermutlich nicht ausscheiden und somit auch nicht zur Verbreitung des Virus beitragen. Die Bedeutung der scheinbar gesunden Gelbhalsmäuse als mögliche Reservoirwirte des Virus ist Gegenstand aktueller Studien. Diese Beobachtungen und Hypothesen



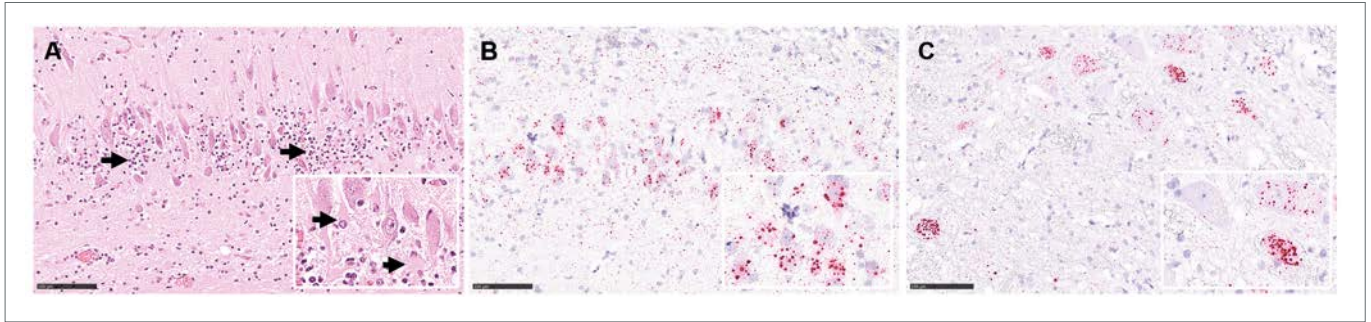


Abb. 1: Histopathologie und Virusgenomnachweis einer RusV-assoziierten Meningoenzephalitis bei einem eurasischen Fischotter (*Lutra lutra*) und einem südamerikanischen Nasenbären (*Nasua nasua*). (A) Nichteitrige Meningoenzephalitis in der Hippocampus-Region des Otters, mit mononukleären Infiltraten (Pfeile) und Verlust von Nissl-Substanz, was auf neuronale Degeneration hinweist, HE-Färbung. (B-C) Nachweis von RusV-RNA in Neuronen der Hippocampusregion des Otters (B) sowie des Hirnstamms des Nasenbären (C), RNA-ISH, chromogene Markierung (Rot) mit Sonden für die kodierende Region des Nichtstrukturproteins p200 Polyprotein von RusV, Mayers Hämatoxylin-Gegenfärbung. Maßstabsbalken 100 µm.

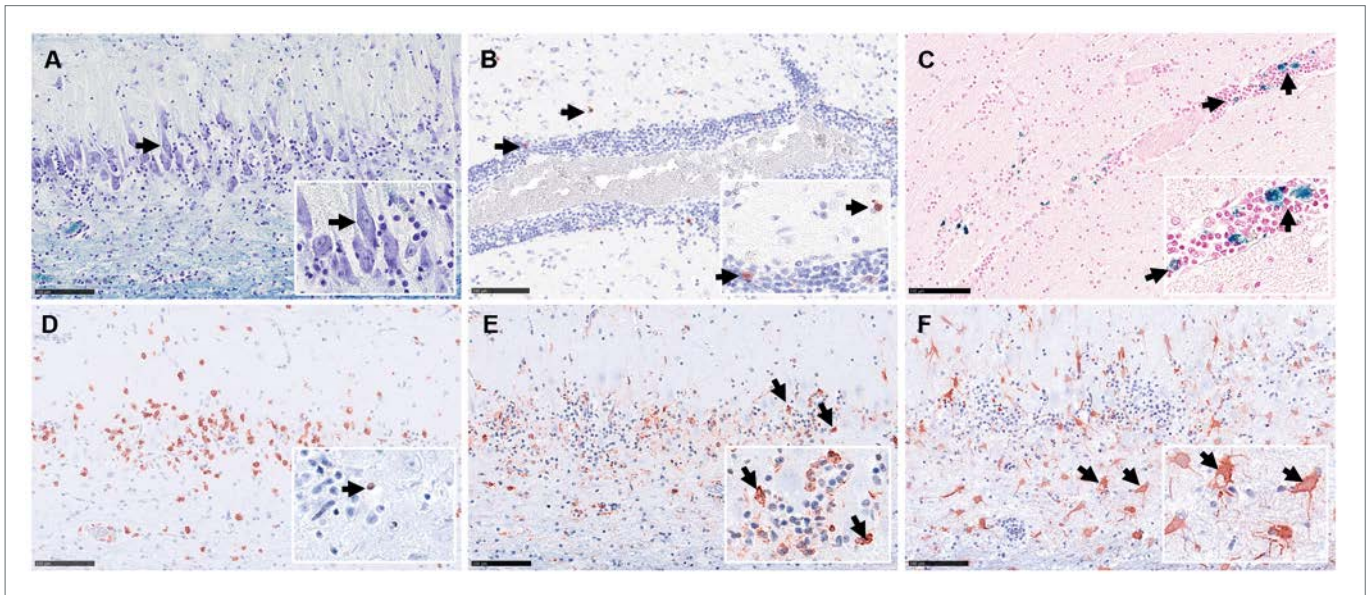


Abb. 2: Spezialfärbungen und immunhistochemische Markierung bei Fällen RusV-induzierter Meningoenzephalitis, exemplarisch hier beim Fischotter im Hippocampus (A, D-F) und im Kortex (B, C). (A) Verlust von Nissl-Substanz mit zentraler Chromatolyse (Pfeil), die auf neuronale Degeneration hinweist, Luxol-Fastblue-Cresylviolett-Färbung. (B) Wenige aktive Caspase-3-immunreaktive (Pfeile) apoptotische Zellen. (C) Multifokal perivaskuläre Makrophagen, positiv für 3-wertiges Eisen in der Berliner-Blaureaktion (Pfeile), was auf eine intravitale Blutung hinweist. (D) Zahlreiche infiltrierende CD3-markierte T-Lymphozyten, aber nur einzelne CD79a-markierte B-Zellen in der gleichen Region (Detaildarstellung mit Pfeil). (E) Hohe Anzahl plumper, IBA-1 immunreaktiver (Pfeile) Mikrogliazellen bzw. Makrophagen. (F) Zahlreiche GFAP-markierte Astrozyten (Pfeile) mit plumper Zellform, die auf eine astrogliale Aktivierung hinweist. (B, D-F) Immunhistochemie, 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, rotbraun), Mayer's Hämatoxylin Gegenfärbung. Maßstabsbalken 100 µm.

müssen ggf. Neubewertet werden, wenn ausreichend Daten über die Inkubationszeit von RusV und weitere Faktoren, die die Infektion beeinflussen könnten, zur Verfügung stehen. RusV infiziert nachweislich ein breites Spektrum von Säugetierwirten. Die sowohl in zoologischen Gärten als auch in Privathaltungen beliebten Bennett-Kängurus scheinen aus bislang ungeklärter Ursache besonders anfällig für RusV-Infektionen zu sein. Grundsätzlich sollte RusV als ätiologische Differentialdiagnose für neurologische Erkrankungen bzw. nichteitrige Meningoenzephalitiden in Deutschland in Betracht gezogen werden. In betroffenen Einrichtungen und Regionen sind Präventionsstrategien, wie Schädnagerbekämpfung, zu empfehlen.

#### Aufruf zur Zusammenarbeit

Um die Pathogenese dieser neuen Krankheit und die epidemiologische Bedeutung der betroffenen Spezies zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Labore für Pathologie und das Nationale Referenzlabor für Bornavirus-Infektionen der Tiere am FLI sind daher interessiert an Fällen nichteitriger Meningoenzephalitis, bei denen bisherige Routineuntersuchungen keine Ursache identifizieren konnten. Von besonderem Interesse ist hierbei eingefrorenes Frischmaterial, Untersuchungen an Formalin-fixiertem Gewebe sind allerdings auch möglich.

## Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei allen Ko-Autoren der in diesem Artikel zusammengefassten Studien. Kathrin Steffen, Weda Hoffmann, Silvia Schuparis, Robin Brandt, Gabriele Czerwinski und Patrick Zitzow danken wir für die hervorragende technische Unterstützung. Ein Teil der Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert (Projekt RubiZoo, Förderkennzeichen 01KI2111).

### Kontakt

Angele Breithaupt

Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit  
Angele.breithaupt@fli.de

Dennis Rubbenstroth

Institut für Virusdiagnostik  
Dennis.Rubbenstroth@fli.de

## Literatur

Bennett AJ, Paskey AC, Ebinger A, Pfaff F, Priemer G, Hoper D, Breithaupt A, Heuser E, Ulrich RG, Kuhn JH, Bishop-Lilly KA, Beer M, Goldberg TL. 2020. Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature* 586:424–428.

Pfaff F, Breithaupt A, Rubbenstroth D, Nippert S, Baumbach C, Gerst S, Langner C, Wylezich C, Ebinger A, Hoper D, Ulrich RG, Beer M. 2022. Revisiting Rustrela Virus: New Cases of Encephalitis and a Solution to the Capsid Enigma. *Microbiology Spectrum* 10.

Voss A, Schlieben P, Gerst S, Wylezich C, Pfaff F, Langner C, Niesler M, Schad P, Beer M, Rubbenstroth D, Breithaupt A, Mundhenk L. 2022. Rustrela virus infection – An emerging neuropathogen of Red-necked wallabies (*Macropus rufogriseus*). *Transboundary and Emerging Diseases* DOI: 10.1111/tbed.14708.

## Serologisches Screening bei Wildwiederkäuern in Deutschland, 2021/22: Kein Hinweis auf das Vorkommen von SARS-CoV-2

Kerstin Wernike und Martin Beer

FLI, Institut für Virusdiagnostik, WOAH Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhoe und Nationales Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease und Schmallenberg-Virus



Kerstin Wernike  
(© W. Maginot, FLI)

### Coronavirus-Serologie

Das aktuelle COVID-19-Pandemiegeschehen, verursacht durch SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2), zeigt, dass Tiere einen wichtigen Faktor in der Dynamik von Infektionskrankheiten darstellen. Vom wahrscheinlichen Ursprung von SARS-CoV-2 in tierischen Reservoirwirten bis zur Gefahr der Etablierung von separaten Übertragungszyklen in Haus-,

Nutz- oder Wildtieren spielen Tiere eine wichtige epidemiologische Rolle. Umfangreiche experimentelle Studien, auch am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), haben gezeigt, dass einige Tierspezies wie beispielsweise Goldhamster, Frettchen und Marderhunde empfänglich für eine Infektion mit SARS-CoV-2 sind, während andere Tierspezies wie Rinder, Schweine, Hühner und Enten kaum bzw. nicht empfänglich sind. Aus der Situation im Feld hat sich zudem gezeigt, dass amerikanische Nerze in Pelztierfarmen eine sehr hohe Empfänglichkeit zeigen. Weiterhin haben experimentelle Infektionsstudien und Feldbeobachtungen in Nordamerika ergeben, dass Weißwedelhirsche hoch empfänglich sind, SARS-CoV-2 effizient vermehren und ausscheiden können und dabei auch Kontakttiere infizieren. Serologische Untersuchungen haben gezeigt, dass ein sehr hoher Prozentsatz von Weißwedelhirschproben aus den Jahren 2020 bis 2022 Antikörper gegen

SARS-CoV-2 aufweist. In-silico-Modellierungen – basierend auf der Aminosäurezusammensetzung und Struktur des SARS-CoV-2-Rezeptors ACE2 – geben einen Hinweis darauf, dass andere Hirschartige (Cerviden) ebenfalls empfänglich für SARS-CoV-2 sein könnten.

Um abschätzen zu können, ob auch europäische Wildwiederkäuerarten betroffen sind, wurden zwischen September 2021 und Januar 2022 in fünf deutschen Bundesländern von Reh-, Rot-, Dam- und Muffelwild und einem Wisent gesammelte Proben serologisch untersucht. Die Probenherkunft und Tierzahl pro Spezies ist der Abb. 1 zu entnehmen. Weiterhin wurden insgesamt 307 Reh-, Rot- und Damwildseren getestet, die zwischen 2017 und 2020 in drei Truppenübungsgebieten der Bundeswehr gesammelt wurden. Von den untersuchten Spezies sind die Rehe die nächsten Verwandten der Weißwedelhirsche (beides Trughirsche [Capreolinae]), Rothirsche und Damhirsche gehören zu den echten Hirschen (Cervinae). Als Screeningtest kam ein ELISA zum Einsatz, der auf der Rezeptor-bindenden Domäne (RBD) von SARS-CoV-2 basiert. Positiv reagierende Proben wurden mittels Neutralisationstest und einem kommerziellen Surrogat-Virus-Neutralisationstest (SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test (svNT) Kit, GenScript) untersucht. Im RBD-basierten ELISA reagierten 25 der 493 (5,1 Prozent; 95 Prozent CI: 3.1 – 7.0 Prozent) im Herbst und Winter 2021/22 gesammelten Wildwiederkäuerproben positiv (Abb.1). Diese Seroreaktivität konnte allerdings in keinem Fall mittels des hochspezifischen Neutralisationstests bestätigt werden. Außerdem trat eine solche Reaktivität auch bei Proben aus den Jahren 2017, 2018 und 2019 auf.

Um zu untersuchen, ob die Reaktivität gegen die RBD von SARS-CoV-2 durch Antikörper gegen ein anderes, bisher unbekanntes Coronavirus des Subgenus Sarbecovirus

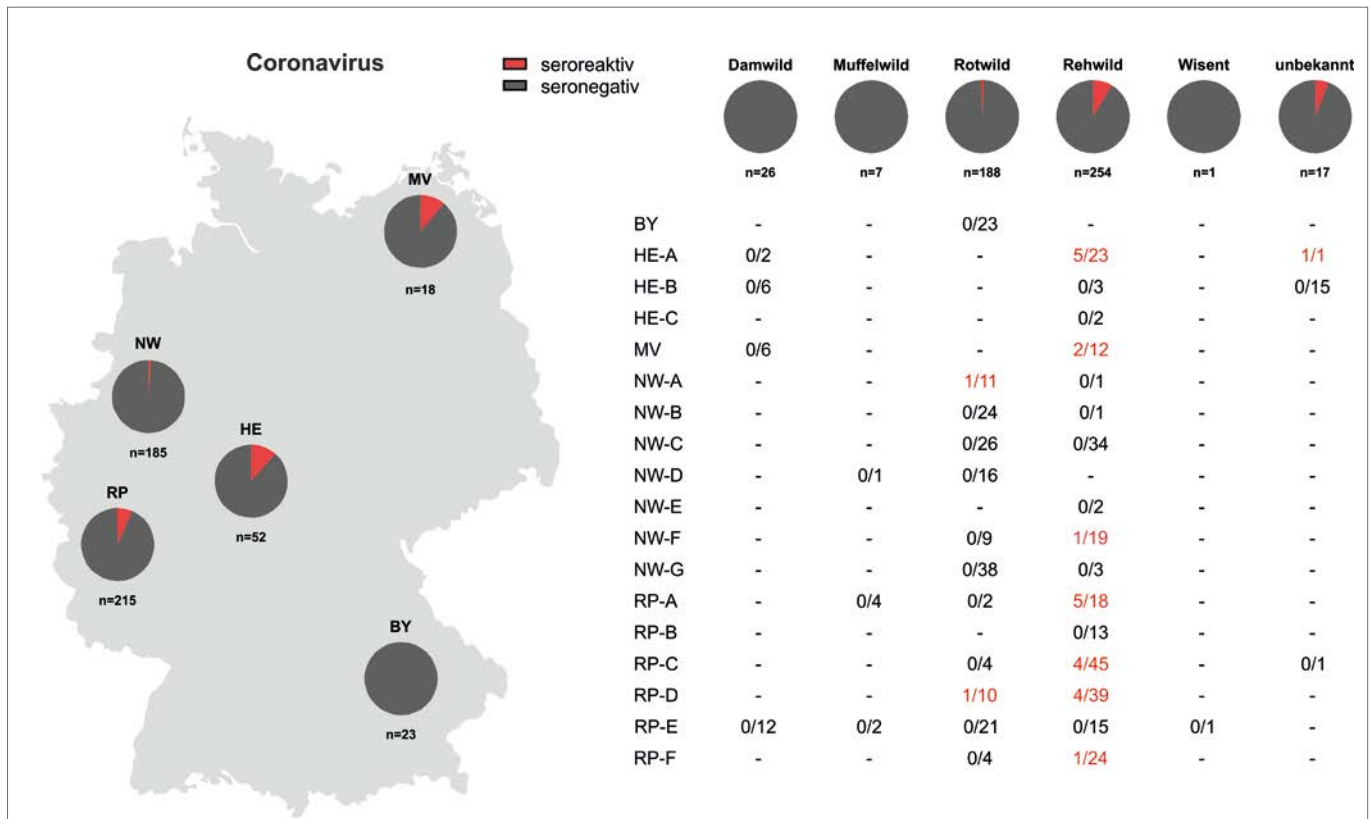


Abb. 1: Anteil der Proben pro Bundesland (links) und pro Wildwiederkäuerart (rechts), die in einem RBD-basierten Antikörper-ELISA positiv (rot) reagierten. In der rechten Abbildungshälfte ist die Anzahl der seroreaktiven Befunde und die Anzahl der analysierten Proben getrennt für jedes Bundesland und gegebenenfalls getrennt nach Forstamt, aus dem die Proben stammen, angegeben. BY – Bayern, HE – Hessen, MV – Mecklenburg-Vorpommern, NW – Nordrhein-Westfalen, RP – Rheinland-Pfalz

verursacht sein könnte, wurden die reaktiven Proben (n = 20) aus dem von Truppenübungsplätzen stammenden Panel mittels eines ELISAs getestet, der auf der RBD von SARS-CoV-1 basiert. In der Durchführung und den Reagenzien entsprach der SARS-CoV-1-RBD-Test dem SARS-CoV-2-RBD-ELISA. 18 von 20 Wildwiederkäuseren reagierten auch im SARS-CoV-1-ELISA positiv, während spezifische SARS-CoV-2-Kontrollen (Rinderserum aus experimenteller Infektion) zu negativen Ergebnissen führten. Daher ist davon auszugehen, dass die Seroreaktivität durch ein anderes Coronavirus verursacht wird, das sowohl mit der RBD von SARS-CoV-1 als auch von SARS-CoV-2 kreuzreagiert. Für eine genauere Klassifizierung dieses kreuzreagierenden Coronavirus ist die Identifizierung mittels PCR und/oder Sequenzanalysen notwendig. Nichtsdestotrotz lässt sich zusammenfassend festhalten, dass heimische Wildwiederkäuerarten derzeit kein relevantes Reservoir für SARS-CoV-2 darstellen.

#### Pestivirus-, BTV- und SBV-Serologie

Da Wildwiederkäuer empfänglich sind für eine Vielzahl von Pathogenen, die auch als Nutztiere gehaltene Wiederkäuer betreffen, stellen Wildtiere eine mögliche Gefahr für einen Wiedereintrag in die Nutztierpopulation dar, sobald ein Erreger in die Wildpopulationen eingetragen wurde und sich dort etabliert hat. Um abschätzen zu können, ob und gegebenenfalls in welchem Umfang Infektionen mit den Pestiviren Bovines-Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) und Border-Disease-Virus (BDV) und den Culicoides-übertragenen

Schmallenberg- (SBV) und Blauzungenvirus (BTV) in der heimischen Wildwiederkäuerpopulation auftreten, wurden die im Herbst und Winter 2021/22 gesammelten Proben zusätzlich serologisch auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen diese Erreger untersucht. In einem ELISA, der die Detektion von anti-BVDV- und anti-BDV-Antikörpern erlaubt (ID Screen BVDV p80 Ab Competition Test, Innovative Diagnostics), haben alle untersuchten Proben negativ reagiert. Daher sind BVDV- und BDV-Infektionen und vor allem das Vorhandensein von persistent infizierten (PI) Tieren in der untersuchten Population sehr unwahrscheinlich.

In einem BTV-spezifischen Test (ID Screen Bluetongue Competition ELISA, Innovative Diagnostics) haben mit einer Ausnahme ebenfalls alle untersuchten Proben negativ reagiert (Abb. 2). Die seropositive Probe stammte von einem Damhirsch unbekanntes Alters, der in Hessen erlegt wurde. Im Gegensatz zu BTV wurden SBV-spezifische Antikörper in einer Vielzahl von Proben nachgewiesen (13.6 Prozent, 95 Prozent CI: 10.6–16.6 Prozent), wobei als Testsystem ein Glykoprotein Gc basierter in-house ELISA zum Einsatz kam. Obwohl das Tieralter nicht für alle Proben bekannt war und daher eine genauere Abschätzung des Infektionsjahres nicht möglich ist, erlaubt der Datensatz einen Vergleich der Infektionsraten mit SBV und BTV. Aufgrund ihrer Ähnlichkeiten im Wirtsspektrum und der für die Übertragung verantwortlichen Insektenspezies haben SBV und BTV große Gemeinsamkeiten in den Hauptfaktoren für die Virusverbreitung. Während anti-SBV Antikörper relativ häufig nachgewiesen



wurden, wurde nur ein einziges BTV-seropositives Tier gefunden. Beides spiegelt die Situation in Hauswiederkäuern (Rinder, Schafe, Ziegen) wider, da SBV-Fälle regelmäßig gemeldet werden, BTV allerdings nur sporadisch auftrat und der letzte Fall im Februar 2021 gemeldet wurde.

Die Unterschiede in den Seropositivitätsraten und die Übereinstimmung zwischen Wild- und Hauswiederkäuern zeigen, dass beide, Wild- und Haustiere, Teil des Übertragungszyklus sind, aber dass Wildtiere alleine, trotz des Vorhandenseins von kompetenten Insektenvektoren, keine signifikante Rolle in der Aufrechterhaltung eines BTV-Infektionsgeschehen in einem spezifischen Gebiet spielen.

Insgesamt ist zudem anzumerken, dass auch in Zukunft solche Surveillance-Programme sinnvoll und notwendig sind, um die aktuelle Situation einschätzen zu können. Es wird empfohlen, in Deutschland eine solche „Wildtier-Surveillance“ zu verstetigen.

### Literatur

Literaturhinweise sind bei den Autoren erhältlich

Originalpublikation erschienen in: Wernike K, Fischer L, Holsteg M, Aebischer A, Petrov A, Marquart K, Schotte U, Schön J, Hoffmann D, Hechinger S, Neubauer-Juric A, Blicke J, Mettenleiter T C, Beer M, (2022). Serological screening in wild ruminants in Germany, 2021/22: No evidence of SARS-CoV-2, bluetongue virus or pestivirus spread but high seroprevalences against Schmallenberg virus. *Transbound Emerg Dis* 2022, 10.1111/tbed.14600, DOI: 10.1111/tbed.14600.

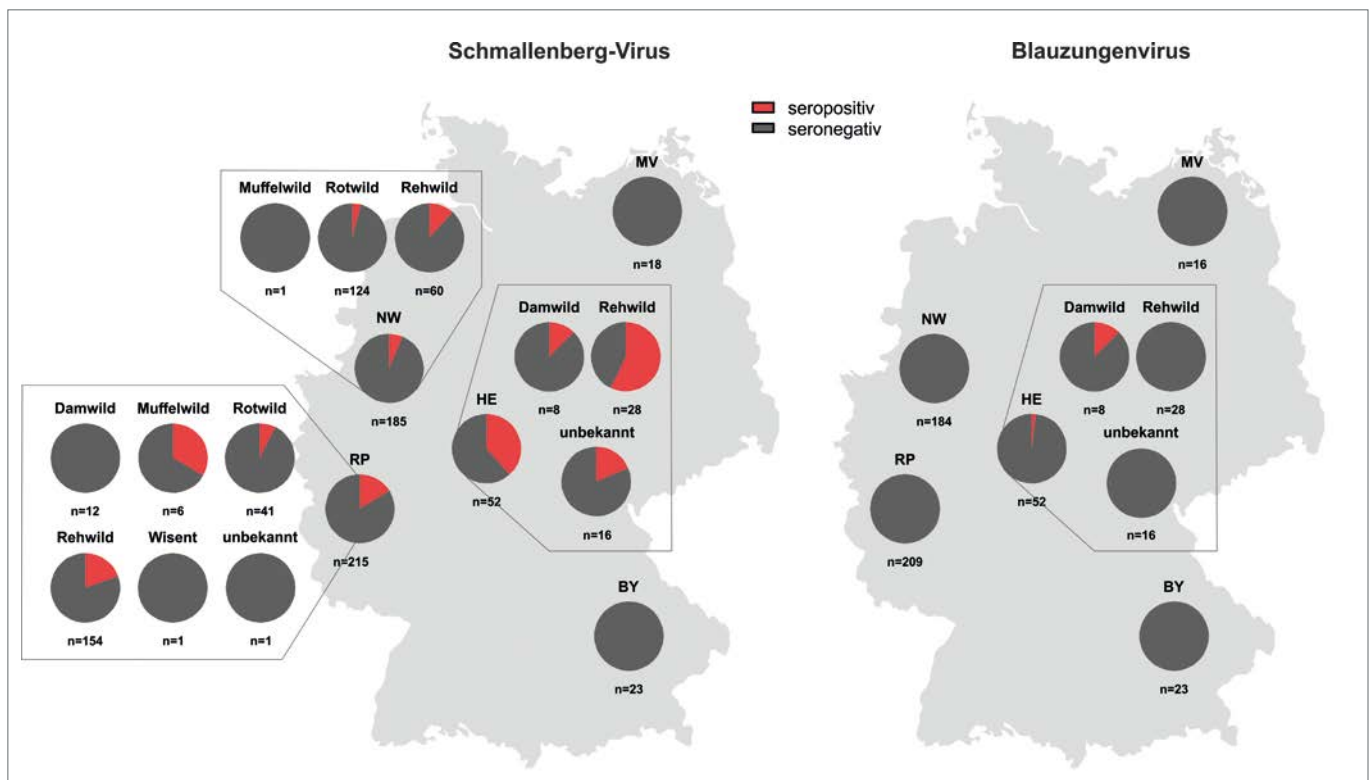


Abb. 2: Anteil der Wildwiederkäuerproben, die positiv (rot) in Antikörperdetektionssystemen für das Schmallenberg-Virus (links) und das Blauzungenvirus (rechts) reagierten. BY – Bayern, HE – Hessen, MV – Mecklenburg-Vorpommern, NW – Nordrhein-Westfalen, RP – Rheinland-Pfalz



# Afrikanische Schweinepest – Genetische Varianten auf dem Vormarsch

Sten Calvelage

FLI, Institut für Virusdiagnostik, Labor für NGS und Microarray-Diagnostik



Sten Calvelage  
(© M. Jörn, FLI)

Vor etwa zwei Jahren fand die Afrikanische Schweinepest (ASP, engl. African swine fever) ihren Weg über die polnische Grenze nach Deutschland. Am 10. September 2020 detektierte das nationale Referenzlabor für ASP auf der Insel Riems zum ersten Mal den Erreger der Krankheit, das Afrikanische Schweinepest-Virus (kurz ASPV, engl. African swine fever virus), bei einem stark verwesenen Wildschweinkadaver aus

dem Brandenburgischen Spree-Neiße Landkreis. Seitdem hat sich das für Wild- und Hausschweine zumeist tödliche Virus kontinuierlich im Osten der Republik ausgebreitet und konnte mittlerweile bei 4.277 Fällen im Schwarzwild und sieben Ausbrüchen in Hausschweinbetrieben (Stand 14.09.2022) nachgewiesen werden. Parallel zur diagnostischen Abklärung von ASP-Verdachtsfällen durch PCR-Nachweisverfahren wurde frühzeitig das Next-Generation Sequencing (NGS) ausgesuchter ASP-Proben etabliert, um die (molekular)epidemiologische Ausbreitung des Erregers in Deutschland zu verfolgen. Hierfür sollten insbesondere Sequenziermethoden der zweiten Generation Anwendung finden, um die etwa 190.000 Basenpaar lange Sequenz des komplexen, doppelsträngigen DNA-Genoms zu entschlüsseln. Insbesondere die beträchtliche Größe des Genoms als auch lange Homopolymer-Regionen und Tandem-Repeats kurzer Genabschnitte stellen hierbei große Herausforderungen für die Sequenzierung und bioinformatische Auswertung dar – ein Umstand, der sich auch in der verhältnismäßig geringen Zahl publizierter ASPV-Vollgenome widerspiegelt und im Kontrast zum nahezu pandemischen Ausmaß dieser Krise steht. Dass die Vollsequenzierung von ASPV dennoch unverzichtbar ist, zeigt das Beispiel Deutschland.

## Genetische Vielfalt von ASPV in Deutschland – Evolution eines pandemischen Erregers

Im Zuge des kontinuierlichen dt. Ausbruchgeschehens wurden im Zeitraum September 2020 bis August 2021 repräsentative ASP-Proben sequenziert und insgesamt 22 neue ASP-Vollgenome neben der bereits im Oktober 2020 veröffentlichten ersten deutschen ASPV-Sequenz (NCBI Accession Nr. LR899193) generiert. Ein Alignment der 23 deutschen Sequenzen konnte die Zuordnung aller Viren zum ASPV-Genotyp II bestätigen, der sich seit seinem Eintrag 2007 nach Georgien in einer Vielzahl osteuropäischer Länder ausgebreitet hat und 2018 seine westlichste europäische Ausdehnung in einem lokal begrenzten Ausbruch in Belgien erreichte.

Weiterhin weisen die 22 neu generierten ASPV-Vollgenome insgesamt 17 charakteristische Mutationen im Vergleich zur LR899193-Sequenz an Positionen im Genom auf, die bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Von diesen 17 Mutationen betreffen 13 Mutationen annotierte offene Leserahmen (engl. open reading frames – kurz ORFs), die in acht Fällen zur Verschiebung des Leserahmens führen. Diese so genannten High-Impact Mutationen sind durch sechs Indels (Insertionen oder Deletionen einer Base) sowie zwei Nonsense-Mutationen (Formation eines Stopp-Codons) in den deutschen ASPV-Sequenzen repräsentiert und haben durch die zumeist hervorgerufene Verkürzung der Aminosäuresequenz einen potentiell großen Einfluss auf die Funktionalität der codierten viralen Proteine. Die verbliebenen fünf Mutationen teilen sich in drei Substitutionen (Austausch einer Aminosäure) und zwei synonyme Mutationen (Basenaustausch ohne Änderung der Aminosäuresequenz) auf und werden aufgrund ihrer geringen Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz als Low-Impact Mutationen geführt. Diese Mutationen zugrunde legend lassen sich mittlerweile fünf Lineages und insgesamt zehn verschiedene ASPV-Varianten definieren, die in deutschen Wildschweinpopulationen verbreitet sind (Abb. 1). Diese Ergebnisse sind insofern bemerkenswert, da trotz der nunmehr über zehnjährigen epidemischen Zirkulation des Genotyp II in Europa bislang nur wenige Mutationen im Virusgenom akkumuliert wurden, geschweige denn sich in viralen Genen manifestieren konnten.

## Von der Vollgenomsequenz zum Varianten-Monitoring – Sanger-Sequenzierung deutscher ASPV-Proben weist geographische Varianten-Cluster nach

Auch wenn die Vollgenomsequenzierung dt. ASPV-Fälle unerlässlich für die Entdeckung neuer Mutationen bleibt, so ist die Methodik aufgrund ihres zeitlichen als auch finanziellen Aufwands nur bedingt für ein weitreichendes Screening von bereits bekannten Varianten geeignet. Aus diesem Grund wurde ein Amplikon-basiertes Sanger-Sequenzierungsverfahren entwickelt, mit dessen Hilfe die im NGS identifizierten mutierten Genombereiche gezielt und effizient nach dem Auftreten der beschriebenen Mutationen gescreent werden konnten. Als Ergebnis konnten im genannten Zeitraum insgesamt 834 dt. ASP-Fälle einer der 10 definierten Varianten zugeordnet werden. Zusammen mit den geographischen Fundorten der jeweiligen ASP-Fälle zeigt sich durch die Formation variantenspezifischer Cluster ein eindeutiger Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Nähe der untersuchten Proben (Abb. 2). Sind Varianten der Lineage IV (IV; IV.1; IV.2; IV.3) bislang hauptsächlich im nordöstlichen Bereich Sachsens und dem südlichen Brandenburgs (Landkreis Spree-Neiße) beschrieben, so findet sich im Osten Brandenburgs (Landkreis Oder-Spree, Dahme-Spreewald, Stadt Frankfurt-Oder) die größte genetische Vielfalt an ASP-Varianten (I; II; II.1; III.1; V), wohingegen Variante III bislang ausschließlich im Norden Brandenburgs detektiert wurde (Landkreis Märkisch-Oderland).

## Treiber genetischer Vielfalt – O174L als potentielles Mutator-Gen

Ein wichtiger Baustein für das Verständnis dieser neuen genetischen Diversität ist mit der Suche von Ursachen für das vermehrte Auftreten von Varianten verbunden. Eine potentielle Erklärung hierfür lässt sich in einer 14 Basenpaar-Duplikation im Gen O174L finden, die zunächst für drei polnische ASPV-Proben beschrieben wurde und bei allen bislang sequenzierten dt. Genomen vorkommt. Das O174L Gen codiert für die DNA-Polymerase X (PolX), ein gut charakterisiertes Enzym des „base-excision repair“-Systems, das unmittelbar an der Replikation des Virusgenoms beteiligt ist. Wie auch die anderen variantenspezifischen High-Impact Mutationen erzeugt die O174L-Mutation eine Verschiebung des offenen Leserahmens, in deren Folge eine Verkürzung um sieben Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins erfolgt

sowie weitere acht Aminosäurereste substituiert werden. Diese Mutationen betreffen insbesondere die C-terminal gelegene Alpha-Helix  $\alpha$ F, die zusammen mit anderen Resten der C-terminalen Region einen Teil einer positiv geladenen Tasche bildet, die die negative Ladung des 5'-Phosphats von DNA-Substraten an Einzelstrang-Brüchen koordiniert. Erste Computermodellierungen der O174L-Mutante weisen auf einen kompensierenden Effekt anderer, z. T. neu eingeführter Aminosäurereste hin, so dass davon auszugehen ist, dass die generelle Funktionalität der PolX erhalten bleibt, sich jedoch kinetische und thermodynamische Parameter des Enzyms vom Wildtyp unterscheiden. Diese Effekte könnten sich mittelbar in Form einer erhöhten genetischen Diversität von ASPV äußern, so wie es für die dt. Fälle gezeigt wurde. Eine finale Klärung der Ursache kann jedoch erst durch weitere gezielte Experimente erreicht werden.

Publikation: DOI: 10.1101/2022.09.07.506908

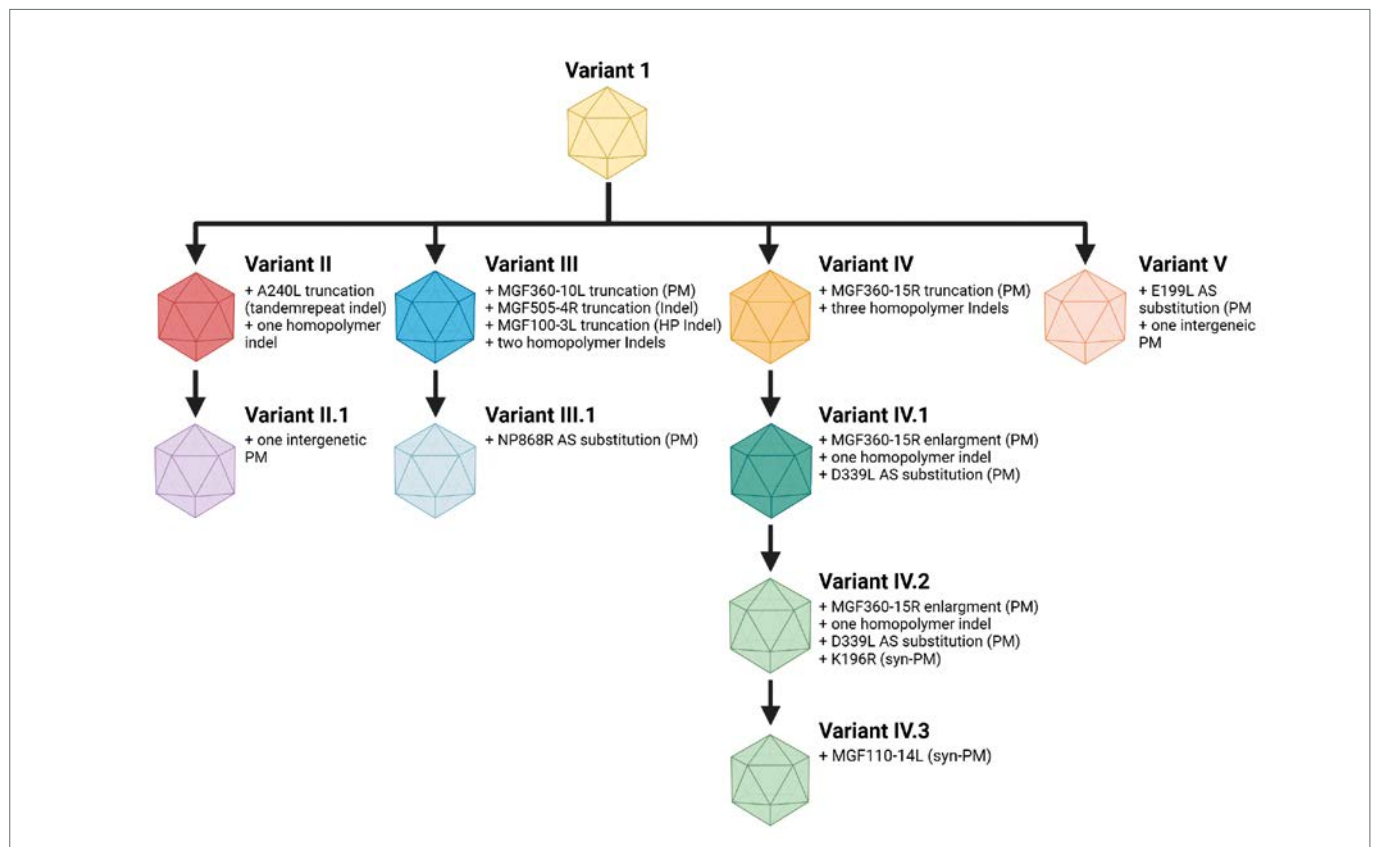


Abb. 1: Übersicht der von September 2020 bis August 2021 gefundenen dt. ASPV-Varianten. Insgesamt fünf Lineages mit zehn verschiedenen Varianten konnten anhand bislang unbekannter Mutationsmarker definiert werden. Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.



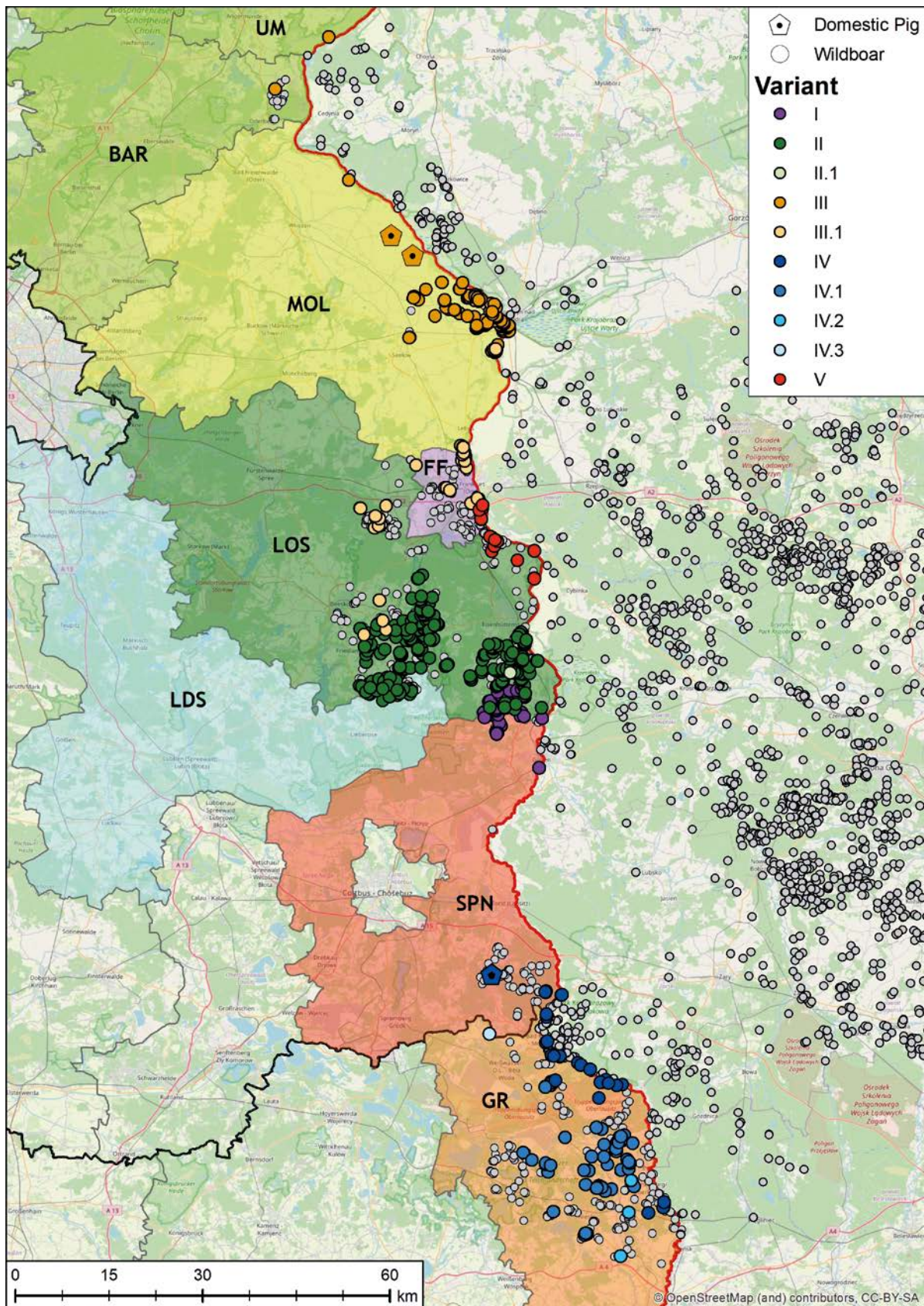


Abb. 2: Verteilung viraler ASPV-Varianten in den Bundesländern Sachsen und Brandenburg nahe der polnischen Grenze (links). Weiße Kreise entsprechen bestätigten ASPV-Fällen in Wildschweinen im Zeitraum vom 10. September 2020 bis 12. August 2021. Varianten, die durch Sanger-Sequenzierung bestätigt werden konnten ( $n=834$ ), sind entsprechend der Legende eingefärbt. Drei im Zeitraum aufgetretene Ausbrüche in Hausschweinbetrieben sind als Pentagon dargestellt und zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen diesen und lokalen ASPV-Varianten im Wildschwein. Abkürzungen der Landkreise/kreisfreien Städte: GR – Görlitz; SPN – Spree-Neiße; LDS – Dahme-Spreewald; LOS – Oder-Spree; MOL – Märkisch-Oderland; BAR – Barnim; UM – Uckermark. Großer Dank geht an das Institut für Epidemiologie und im Speziellen an PD Dr. Carola Sauter-Louis für die Anfertigung und Bereitstellung dieser Abbildung.



## Außerhalb des Riemser Zauns: Infektionserregern auf der Spur

Francesca Isabel Rondi und Anja Globig

FLI, Institut für Internationale Tiergesundheit / One Health

Als im Winter 2006 erstmalig das hochpathogene aviäre Influenza Virus (HPAIV) des Subtyps H5N1 die Insel Rügen in Deutschland erreichte und daraufhin viele Wildvögel in ganz Deutschland an den Infektionen verendeten, wurde noch im selben Jahr durch das FLI ein Sentinel-Surveillance System zur kontinuierlichen Nachweismöglichkeit von aviären Influenzaviren (AIV) bei wilden Wasservögeln etabliert. Seitdem basiert das Sentinel-Überwachungssystem auf der naturnahen Haltung und regelmäßigen Untersuchung von etwa 10-20 Stockenten (*Anas platyrhynchos*) auf AIV in der Umwelt. Dabei werden die Enten täglich klinisch untersucht. Abstriche aus Oropharynx und Kloake erfolgen zweiwöchentlich, eine Blutentnahme zur Serumgewinnung alle zwei bis drei Monate. Zwischen 2006 und 2022 traten Übertragungen von AIV aus der freien Wildbahn immer wieder auf, insbesondere durch direkten Kontakt mit Artgenossen, oder indirekt über die Aufnahme von fäkal-kontaminiertem Wasser.

Ab 2020 wird zusätzlich auf das Vorhandensein von ESBL-produzierende *E. coli* untersucht. Diese Bakterien können viele Antibiotika hydrolysieren und unwirksam machen, wodurch das Phänomen der Antibiotikaresistenz verstärkt wird. Diese Keime verbreiten sich mehr und mehr, wobei nicht klar ist, in wieweit sie auch in naturnahen Ökosystemen Eintritt gefunden haben. Ein bakteriologischer Tupfer aus entweder Kot oder der Kloake wird untersucht, indem es auf einem mit Cefotaxim angereicherten Chromagar-Medium gezüchtet, die resistenten Kolonien ausgewählt und isoliert werden.

Zusätzlich wird alle drei Tage eine Probe des Futterwassers bzw. Kotproben genommen, um das Vorhandensein von AIV/ESBL *E. Coli* zu testen. Diese Umweltproben überbrücken die Zeit bis zu den direkten Abstrichproben der Enten. Wenn in der Nähe des Käfigs interessantes biologisches Material entdeckt wird, z. B. Kot oder Tierkörper, wird auch dieses beprobt.

Um die Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen umfassender zu verstehen, werden weitere Parameter berücksichtigt: Neben einer kleinräumigen Wildvogelerfassung werden täglich Windgeschwindigkeit, Windrichtung, Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Wasserstand im Käfig im Rahmen der Umweltkontrollen aufgezeichnet. Drei Kameras, die einen weiten Blick auf das Land und das Wasser haben, umgeben den Käfig und nehmen zu jeder Tageszeit Tiere auf, die sich ihnen nähern, wobei die Uhrzeit, das Datum des Kontakts und die Temperatur aufgezeichnet und ausgewertet werden.

### Pathogenfund im Zusammenhang mit verschiedenen Umweltfaktoren

Zwei der 70 Proben, die zwischen März und Juni 2022 untersucht wurden, eine von einer adulten Ente und die andere von einem im Mai geschlüpften Entenküken, wurden positiv auf das Vorhandensein von ESBL-produzierenden *E. coli* getestet. Da das Entenküken zum Zeitpunkt des Nachweises maximal vier Wochen alt war und das Gebiet nie verlassen hat, stellt sich die Frage, ob ESBL-produzierende *E. coli* bereits bei Wildenten zirkulieren und übertragen werden.

Eine „stille“ Infektion von HPAI H5N1 trat zwischen Weihnachten und Neujahr 2021/22 auf, eine Zeit, in der die direkte Entenbeprobung aus feiertäglichen Gründen einmal ausfiel, so dass der Nachweis nur aus Kotproben gelang, später allerdings durch Antikörpertests im ELISA bei allen Enten bestätigt werden konnte. Niedrig pathogene AIV wurden im Februar und September nachgewiesen, u.a. in den Futterwasserproben. Zu keiner Zeit zeigten die Enten Krankheitssymptome, was bestätigt, dass ihr Immunsystem HPAIV ebenso wie niedrig pathogene AIV toleriert, trotzdem von infizierten Enten ausgeschieden wird, wenn auch nur für einen kurzen Zeitraum (ca. 7-10 Tage) und in geringer Menge.

Fünfzehn Vogel- und sieben Säugetierarten wurden von den Kameras erfasst, mit denen die Enten unmittelbaren oder mittelbaren Kontakt hatten. Die Analyse der Wildkamera-Fotos ergab, dass die Zahl der Vögel in dem Gebiet, insbesondere der Wasservögel, zwischen März und Juli 2022 deutlich zurückging: Migrierende Wasservögel sammeln sich hauptsächlich im Winter und im Frühjahr im Greifswalder Boddengebiet. Darüber hinaus zeigten die Bilder, dass Interaktionen mit Säugetieren hauptsächlich nachts, Interaktionen mit Vögeln dagegen nur tagsüber und bei günstigem Wetter stattfanden.

Ein Vergleich der täglich erfassten Umweltparameter mit den Infektionen ergab, dass eine Infektion mit AIV bei den Enten gehäuft zur Zeit der niedrigsten Temperatur, der höchsten Luftfeuchtigkeit, nach einigen Windspitzen und bei hohem Wasserstand erfolgte. Allerdings können nur langfristige Beobachtungen wirklich aussagekräftig sein.

### Wildfotografisches Datenmaterial gibt Hinweise auf ein Familienglück und ein Familiendrama

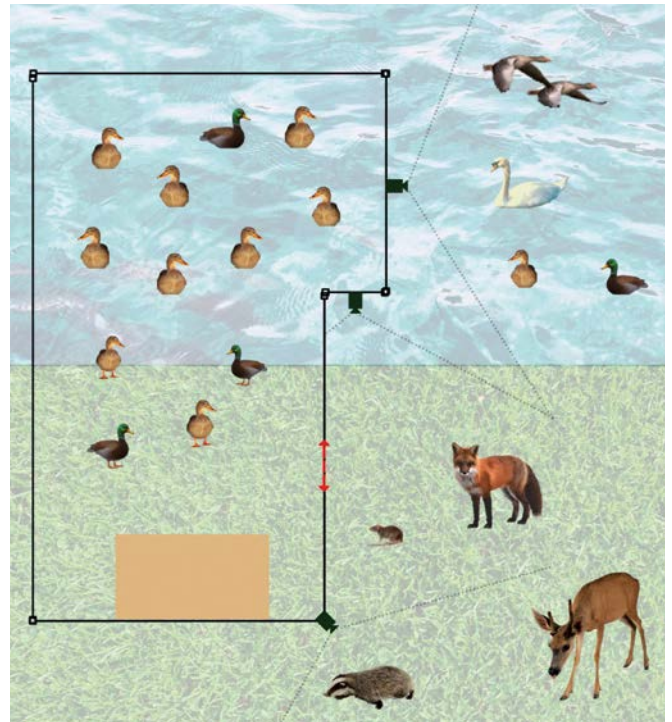
Welche Rolle eine ganzheitliche Betrachtung der Gegebenheiten spielt, zeigt folgendes Beispiel: Auf der Insel Riems brüten seit einigen Jahren Kolkraben, die meist auch mindestens ein Junges großziehen. Im Frühsommer verschwand die Familie, und erst jetzt wird wieder ein Rabe regelmäßig beobachtet. Etwa zur gleichen Zeit ihres Verschwindens ermittelten die Bilder der Wildkamera, dass eine Fähe zwei Junge führte. Aus naheliegenden Gründen lockte das Entengehege die Füchse an. Im Juni 2022 zeigten Kamerabilder, dass die Jungfüchse Tierkörperreste transportierten, die als Spielzeug dienten. Eine Sammlung



von Kadaverresten von verschiedenen Vogelarten (Rabenvogel, Kormorane, Schwäne, Eichelhäher), drei Igel und einem Steinmarder in unmittelbarer Umgebung der Anlage war in dieser Zeit sehr auffällig. Untersuchungsfähige Proben ließen sich nur aus den Federkielen nehmen, in denen sich tatsächlich noch etwas Flüssigkeit befand, und aus eben diesen Federkielen von Rabenvogel- und Kormoran-Armschwingen ließ sich HPAIV H5N1 im Juni nachweisen.

Zu dieser Zeit waren keine Infektionen mit AIV bei den Enten nachweisbar, und das wirft weitere Fragen auf. Ab wann sind sie nach erfolgter Infektion mit HPAI H5 Viren erneut empfänglich für eine Infektion? Ist Wasser für die Ausbreitung wesentlich entscheidender als jeder andere Kontakt? Welche Umweltfaktoren spielen für die Ausbreitung innerhalb eines Ökosystems eine Rolle? Weitere Beobachtungen in der ganzheitlichen und langfristig angelegten Studie sind erforderlich.

\*Die in diesem Artikel vorgestellten Ergebnisse wurden neben den Autorinnen auch durch Sylvia Dreyer (AMR), Timo Homeier-Bachmann (AMR), dem AI-Referenzlabor unter Leitung von Timm Harder (Sub- und Pathotypisierung der AIV-positiven Proben) und Anne Günther (Serologie) erbracht. Herzlichen Dank, auch an die vielen ungenannten Helferinnen und Helfer im Projekt!



Das Sentinelsystem im naturnahen Ökosystem (© FLI)

### Vogelarten im Kontakt

Amsel (*Turdus merula*), Blässhuhn (*Fulica atra*), Elster (*Pica pica*), Graugans (*Anser anser*), Haussperling (*Passer domesticus*), Höckerschwan (*Cygnus olor*), Kormoran (*Phalacrocorax carbo*), Nebelkrähe (*Corvus cornix*), Ringeltaube (*Columba palumbus*), Schnatterente (*Mareca strepera*), Sperber (*Accipiter nisus*), Stockente (*Anas platyrhynchos*)



(© Wildtierkamera, FLI)

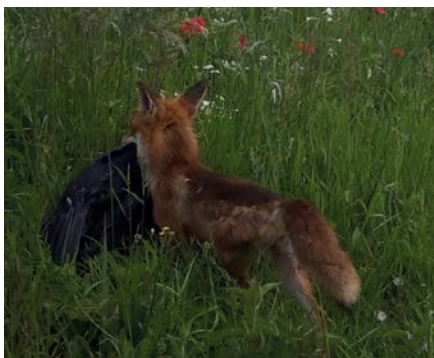
### Säugetierarten im Kontakt

Dachs (*Meles meles*), Nutria (*Myocastor coypus*), Otter (*Lutra lutra*), Reh (*Capreolus capreolus*), Rotfuchs (*Vulpes vulpes*), Wanderratte (*Rattus norvegicus*), Waschbär (*Procyon lotor*)

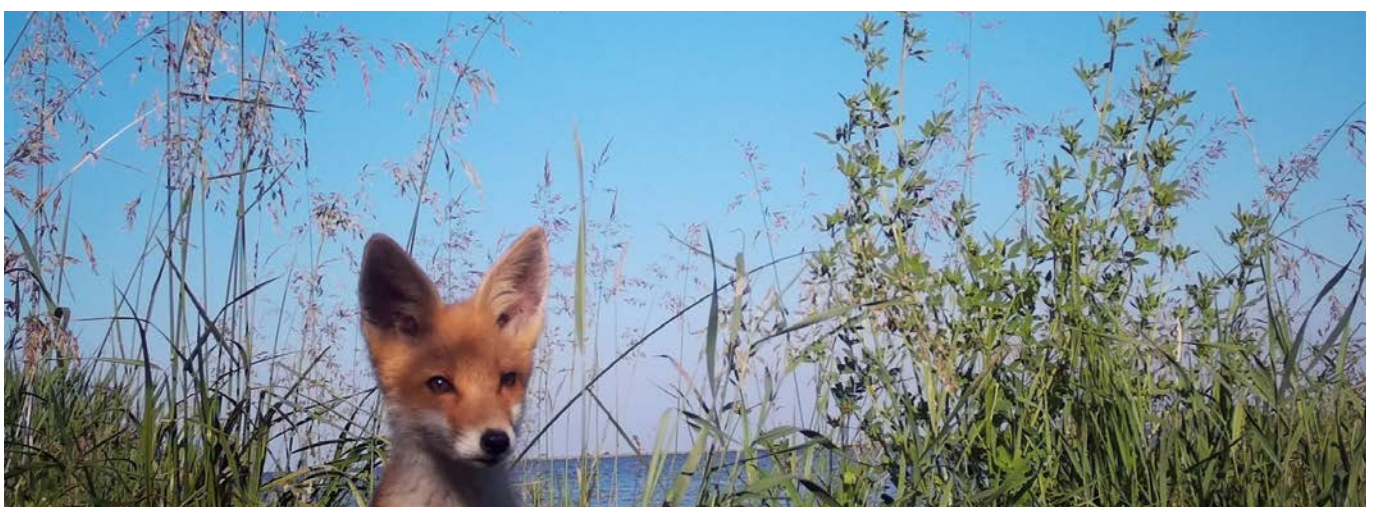


(© Wildtierkamera, FLI)





*Meister Reinicke trägt Kadaver und anderes biologisches Material (z. B. Eier) aus der Umgebung an der Anlage zusammen. (© F. I. Rondi, Wildtierkamera, FLI)*



*Glücklicher kleiner Rotfuchs in der Blüte des Grases und seines Lebens. Schaut er so zufrieden über das große Los, einen „reich gedeckten Tisch“ zu finden? Die von ihm zusammen gesammelten Federreste eines Rabenvogels und Kormoran ergaben im Juni einen HPAIV Nachweis. Nach wie vor zeigen die Kamerabilder die drei Füchse an der Anlage. Sie sind weder dem Virus noch den Autos auf dem Damm zum Opfer gefallen. (© Wildtierkamera, FLI)*



## Nationales Tierwohl-Monitoring

Karen Kauselmann für das FLI-Team\*

FLI, Institut für Tierschutz und Tierhaltung

Das Thema Tierwohl gewinnt in Deutschland zunehmend an Bedeutung. Über den Status quo und die Entwicklung des Tierwohls in der Tierhaltung sowie beim Transport und der Schlachtung fehlen jedoch bislang fundierte Berichterstattungen. Das Ziel des Projekts „Nationales Tierwohl-Monitoring“ (NaTiMon) ist es, die Grundlagen für eine solche Berichterstattung zu erarbeiten. Dabei werden die Tierarten Rind, Schwein, Huhn und Pute, Schaf und Ziege sowie Regenbogenforellen und Karpfen einbezogen. Das Institut für Tierschutz und Tierhaltung (ITT) des Friedrich-Loeffler-Instituts bearbeitet im Projekt NaTiMon den Bereich „Transport und Schlachtung“ von Rind, Schwein und Geflügel.



Logo des Projekts „Nationales Tierwohl-Monitoring“

Zunächst wurde im Rahmen des Projekts eine umfassende Literaturrecherche zu Tierwohl-Indikatoren durchgeführt. Als Ergebnis dieser Recherche entstand die „Literaturdatenbank Tierwohlindikatoren“, in der 5.224 Tierwohlindikatoren und 52 Tierwohl-Begleitindikatoren abrufbar sind, die je nach Interesse des Nutzens gefiltert werden können. Darauf basierend wurde eine Vorauswahl an Indikatoren getroffen, die sich für ein nationales Tierwohl-Monitoring eignen könnten. Diese wurden in Fachgesprächen mit relevanten Stakeholdern aus den Bereichen Tierhaltung, Transport und Schlachtung diskutiert, um die Anzahl der Indikatoren einzugrenzen. Um weitere Expertinnen und Experten in die Auswahl der Indikatoren einzubeziehen, wurde im Anschluss eine Onlinebefragung durchgeführt, in der eine noch größere Anzahl an Spezialistinnen und Spezialisten für die Bereiche Tierhaltung, Transport und Schlachtung die Indikatoren als „geeignet“ oder „nicht geeignet“ für ein Tierwohl-Monitoring bewerten konnte. Im Bereich „Schlachtung“ wurde im Rahmen der Onlinebefragung der Indikator „Betäubungseffektivität“ am häufigsten als geeignet bewertet, während im Bereich „Transport“ die Indikatoren „gebrochene/luxierte Flügel/Beine“ (Geflügel) und „Ladedichte“ (Rind und Schwein) als besonders gut geeignet eingeschätzt wurden. Um die Praxistauglichkeit dieser und weiterer ausgewählter Indikatoren zu erproben, führen die Projektmitarbeiterinnen des FLI derzeit Probeerhebungen auf Schlachtbetrieben sowie Kontroll- und Sammelstellen durch (Abb.).



Abb.: Projektangestellte bei einer Probeerhebung im Schlachtbetrieb, v. l. n. r. Cindy Nyanzi, Sally Lühken, Karen Kauselmann (© S. Zang, KTBL)

Am Ende der Projektlaufzeit soll ein umfassender Bericht über die zukünftige Umsetzung eines nationalen Tierwohl-Monitorings sowie die erforderlichen Voraussetzungen und entstehenden Kosten als Empfehlung an die Politik übergeben werden.

Neben dem FLI (ITT) sind am Projekt „Nationales Tierwohl-Monitoring“ die Hochschule Osnabrück (Geflügelhaltung), das Thünen-Institut für Ökologischen Landbau (Rinderhaltung), die Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Schweinehaltung), die Humboldt-Universität zu Berlin (kleine Wiederkäuer), die Tierärztliche Hochschule Hannover und das Thünen-Institut für Fischereiökologie (Regenbogenforellen und Karpfen) sowie das Statistische Bundesamt (Datenerhebung und -aufbereitung), das Thünen-Institut für Betriebswirtschaft (Tierwohl-Begleitindikatoren, Stakeholderanalyse und Kostenerfassung) und das Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (Stakeholderanalyse, Fachgespräche und Kostenerfassung) an der Bearbeitung des Projekts beteiligt. Gefördert wird das Projekt aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des Parlaments der Bundesrepublik Deutschland über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE).

### FLI-Team\*

Lars Schrader, Michael Marahrens, Sally Lühken, Karen Kauselmann, Isa Kernberger-Fischer, Cindy Nyanzi

### Link zur Literaturdatenbank:

[www.ktbl.de/webanwendungen/literaturdatenbank-tierwohlindikatoren](http://www.ktbl.de/webanwendungen/literaturdatenbank-tierwohlindikatoren)

## 10. RIEMSER DIAGNOSTIKTAGE

### Riemser Diagnostiktag – Familientreffen der Veterinärmedizin

Martin Beer

FLI, Institut für Virusdiagnostik



Martin Beer  
(© J. King, FLI)

Nun ist es soweit: Die Riemser Diagnostiktag (RDT) sind volljährig! 2022 begehen wir, pandemiebedingt etwas verspätet, mit den 10. RDT ein Jubiläum, das uns auch einen Blick zurück auf nunmehr 19 Jahre bewegter Zeiten mit unterschiedlichsten Anforderungen an die Veterinärmedizin erlaubt.

Waren es vor dem Jahr 2003 einzelne Referenzlabortreffen (sog. „Workshops“) wie z.B. zur klassischen Schweinepest, zu BHV-1 oder zu Fischkrankheiten, so bündeln die RDT nun im zweijährigen Abstand all diese Aktivitäten in einer Veranstaltung und erlauben einen umfassenden Informationsaustausch, insbesondere zwischen den Referenzlaboratorien des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) und den Veterinärmedizinerinnen und Veterinärmedizikern der Untersuchungseinrichtungen der Länder. Das alles immer mit der wichtigen und tatkräftigen Unterstützung der heutigen DVG-Fachgruppe AVID (Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik).

Unvergessen sind beispielsweise die Diskussionen zum Einsatz der Anfang der 2000er Jahre gerade aufkommenden und heute so zentralen Real-Time PCR (qPCR)-Analysen. Was ist ein Ct-Wert, wie standardisiert man die qPCR? Wie gut geht das mit RNA-Viren und welche Standards bzw. Kontrollen sind notwendig? Wie kann man poolen? Wie lässt man PCR-Kits zu? Hier haben das FLI, der AVID und alle Kolleginnen und Kollegen bedeutende Pionierarbeit geleistet. Und das mehr als 15 Jahre bevor die SARS-CoV-2-Pandemie auch die humanmedizinische PCR-Diagnostik aus dem Dornröschenschlaf geweckt hat. Die anfangs so ungeliebten (weil teuren) kommerziellen Kit-Systeme sind heute Standard, genauso wie das Poolen von Proben und die vollautomatische Nukleinsäureextraktion. Mit der Einschleppung von HPAIV H5N1 und dann auch BTV-8 im Jahr 2006 erreichte die molekulare Diagnostik auf Basis der qPCR einen ersten Höhepunkt und die RDT haben sicher einen Anteil daran, dass die Technologie einsatzbereit war und in der Folge auch abgestimmt weiter standardisiert und zielgerichtet in der Massendiagnostik eingesetzt werden konnte.

Ein ähnlicher Meilenstein kam einige Jahre später mit der Technologie der Hochdurchsatzsequenzierung (*Next-Generation Sequencing*, NGS). Im Herbst 2011, kurz vor den RDT – und dort dann auch „noch ganz frisch“ vorgestellt – die Entdeckung des Schmallenberg-Virus (SBV). Die Technik der Metagenomdiagnostik war noch sehr jung und dieser Vortragsblock konnte würdig auf den RDT präsentiert werden. Noch heute zirkuliert SBV in Deutschland und beschäftigt die Veterinärmedizin. Dann kam 2015 wieder passend zu den

Diagnostiktagen die Entdeckung des zoonotischen Bornavirus der Bunthörnchen (VSBV-1) mittels NGS. Auch diese Technik ist mittlerweile Alltag und im Rahmen der letzten RDT fand ein entsprechender Workshop zur Minlon-basierten Sequenzierung statt, kurz bevor mit dieser Technik Millionen SARS-CoV-2-Genome erfasst wurden. Allerdings gelingt nicht jedes Mal die Präsentation eines neuen Erregers. Die Beispiele zeigen aber, dass auf Aktualität Wert gelegt wird und die RDT immer für Überraschungen gut sind. Deutlich wird der Virusschwerpunkt, der sicher im Tagungsstandort in Greifswald – Insel Riems, der Wiege der Virologie, und der Entstehungsgeschichte der RDT begründet liegt. Bei aller Euphorie für neue Technologie spielen die Standardtechniken und ihr Einsatz weiterhin eine wichtige Rolle. Sicher kann der ein oder andere sich noch an den Vortragsblock „Steinzeitvirologie“ erinnern, der Virusisolation, Elektronenmikroskopie und klassische Serologie sowie deren Bedeutung, auch in Zeiten der Molekulardiagnostik, zum Thema hatte.

Woran erkennt man nun jemanden, der bei den Diagnostiktagen dabei war? Ganz einfach, er ist stolzer Besitzer eines ökologisch einwandfreien Holzkugelschreibers mit der Aufschrift X. Riemser Diagnostiktag. Es geht sogar das Gerücht um, es gäbe unverkäufliche Komplettsammlungen aller neun (zukünftig dann zehn) Stifte.

Das Herz der Diagnostiktag sind die (Fach)Gespräche in den Pausen, beim *Get-Together* oder beim obligatorischen gemeinsamen Abendessen. Hier werden nochmal die jeweils drängendsten Probleme der Veterinärmedizin besprochen, vom unspezifischen BHV-1-ELISA bis zu den Problemen der KSPV-RT-PCR. Das ist der Geist der Diagnostiktag. Sie wollen ein Forum für den intensiven fachlichen und kollegialen Austausch bieten. Der Blick zurück zeigt aber auch, dass es sich bei den Riemser Diagnostiktagen um ein intensives „Familientreffen“ handelt, bei dem die verschiedenen Referenzlabore des FLI die Möglichkeit haben, gebündelt Informationen und allerneueste Erkenntnisse weiterzugeben.

Zurückblickend erkennt man dann auch, was die Veterinärmedizin in den letzten Jahrzehnten bewältigt hat oder noch bewältigen muss: z.B. BSE-Krise, KSP-Ausbrüche, Einschleppung von HPAIV H5N1, BTV-8, SBV, USUV und WNV, Umgang mit anderen neuen Erregern wie VSBV-1, die Eradikation von BHV-1 und BVDV, und die erschreckende ASPV-Ausbreitung.

Um den notwendigen Informationsaustausch – auch nach dem Motto „Tipps und Tricks“ für die Alltagsdiagnostik – wieder in Präsenz zu ermöglichen, haben wir mit den 10. Riemser Diagnostiktagen etwas gewartet, um uns jetzt endlich wieder vor Ort zu treffen! Die zusätzliche Möglichkeit der Online-Teilnahme ist zeitgemäß und erweitert den Kreis derjenigen, die Zugang zu den Vorträgen bekommen, nochmals erheblich. In diesem Sinne freue ich mich sehr auf hochspannende Vorträge, fruchtbare Diskussionen und den bewährten kollegialen Austausch!





Dank PCR sind auch Probenberge in Ausbruchsjahren beherrschbar. (© J. King, FLI)



Auch bekannt durch Funk und Fernsehen: Der Workshop zur Minlon-basierten Sequenzierung zu den 9. RDT 2019 fand auch medialen Anklang. (© J. King, FLI)



Rocket Science oder Steinzeitvirologie? Die Veterinärmedizin setzt auf bewährte Methoden wie Virusisolation, Elektronenmikroskopie und klassische Serologie ebenso wie auf neue und weiterentwickelte molekularbiologische Techniken. (© J. King, FLI)



Begehrtes Sammlerobjekt: der Tagungskugelschreiber (© J. King, FLI)



Willkommen zum „Familientreffen“! (© J. King, FLI)

## 10. RIEMSER DIAGNOSTIKTAGE – 24. – 25. November 2022

### Hybridveranstaltung Alfried Krupp Wissenschaftskolleg Greifswald / Zoom

#### Tagungsprogramm

##### Donnerstag, 24. November

08:00	Registrierung	12:00	Mittagspause
08:45	<b>Begrüßung</b> (Prof. Dr. T. C. Mettenleiter, Präsident Friedrich-Loeffler-Institut (FLI); Prof. Dr. M. Beer, Leiter Institut für Virusdiagnostik)	13:30	<b>Aktuelles aus den Referenz- und Konsiliarlaboren: von CAE bis RHD</b> (Dr. P. König, FLI, Insel Riems)
09:00	<b>Aktuelles zum Tierseuchenrecht</b> (Dr. B. Hoffmann, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bonn)	13:45	<b>Nachweis von Newcastle Disease Impfviren und Differenzierung von Genotyp I und II Impfstämmen: Ein Fallbericht</b> (PD Dr. C. Grund, FLI, Insel Riems)
09:30	<b>Aktuelle ASP-Situation</b> (PD Dr. C. Sauter-Louis, FLI, Insel Riems)	14:00	<b>Aktuelles aus dem NRL für SARS-CoV-2 Infektionen bei gehaltenen Tieren</b> (Dr. M. Keller und PD Dr. K. Wernike, FLI, Insel Riems)
09:45	<b>ASP-Diagnostik – Bericht aus dem NRL</b> (PD Dr. S. Blome, FLI, Insel Riems)	14:15	<b>SARS-CoV-2: Kampf der Varianten</b> (Dr. L. Ulrich, FLI, Insel Riems)
10:00	<b>Zwei Jahre ASP im Land Brandenburg. Methodische Aspekte, Untersuchungslogistik und Status quo.</b> (Dr. S. Bock, Landeslabor Berlin-Brandenburg, Frankfurt/Oder)	14:30	<b>CoV-Gen: Erfahrungen aus genomischer SARS-CoV-2 Surveillance in Mecklenburg-Vorpommern, 2021/2022</b> (Dr. K. Goller, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald)
10:15	<i>Tee-/Kaffeepause</i>	14:45	<b>Betacoronaviren in Bayern – sowieso ubiquitär oder doch besser aufpassen?</b> (PD Dr. A. Neubauer-Juric, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim)
10:45	<b>Veterinär diagnostika für die Infektionsdiagnostik Gestern – Heute – Morgen?</b> (Dr. C. Schroeder, Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, Bad Langensalza)	15:00	<b>Aviäre Coronaviren: die tägliche Herausforderung von Mutationen, Rekombinanten und Varianten</b> (H. Bischoff, AniCon Labor GmbH, Hoeltinghausen)
11:00	<b>Von Echtzeit Sequenzierung zu Echtzeit Datenanalyse: Was kommt nach der Nanopore Sequenzierung?</b> (Dr. J. King, FLI, Insel Riems)	15:15	<i>Tee-/Kaffeepause</i>
11:15	<b>Metagenomscreening – echte Proben oder in silico?</b> (Dr. F. Pfaff, FLI, Insel Riems)	15:45	<b>Bleibt HPAIV ganzjährig in Deutschland? Folgen für Diagnostik und Prävention.</b> (Prof. Dr. T. Harder, FLI, Insel Riems)
11:30	<b>Ein potenzielles Tool gegen die Antibiotikaresistenz bei Haustieren – Bakteriophagen und ihre Wirksamkeit</b> (E. M. Kalbhenn, LABOKLIN GmbH & Co. KG, Bad Kissingen)	16:00	<b>New tools to fight Avian Influenza</b> (Dr. S. Hundt, CEVA Tiergesundheit GmbH, Riems)
11:45	<b>Entwicklung neuartiger Probencontainer zur standardisierten Entnahme, Stabilisierung und Inaktivierung von Veterinärproben</b> (Dr. R. Wyrich, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)	16:15	<b>Impfmonitoring und DIVA-Testing für aviäre Influenza A Viren der Subtypen H5</b> (K. Klewer-Fromentin, Innovative Diagnostics, Grabels, Frankreich)
		16:30	<b>Influenza Diagnostik – 3 auf einen Streich</b> (Dr. K. Schramedei, INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Leipzig)

- 17:30 *Abfahrt nach Stralsund*
- 18:30–  
19:30 **Highlightführung Ozeaneum**
- 20:00 **Gemeinsames Abendessen, Ozeaneum**
- 21:00 **After-Dinner Speech**  
(Prof. Dr. T. C. Mettenleiter, FLI, Insel Riems)
- 23:00/  
23:30 *Rückfahrt nach Greifswald*

## Freitag, 25. November

- 08:30 **Nicht invasive und indirekte Methoden zur Untersuchung von Krankheitserregern und Biodiversität**  
(Prof. Dr. F. Leendertz, Helmholtz-Institut für One Health, Greifswald)
- 09:00 **„To be infected or not to be infected“ das ist die Frage: in der aktuellen Affenpockendiagnostik bei Haustieren**  
(PD Dr. D. Hoffmann, FLI, Insel Riems)
- 09:15 **One Health Capacity Building in der Labordiagnostik**  
(PD Dr. S. Knauf, FLI, Insel Riems)
- 09:30 **Vom Labor ins Feld – Tollwutbekämpfung in Namibia**  
(Dr. C. Freuling, FLI, Insel Riems)
- 09:45 **Rustrela-Virus (RusV): ein neuer Enzephalitiserreger bei Haus- und Zootieren**  
(PD Dr. D. Rubbenstroth, FLI, Insel Riems)
- 10:00 **Erste Pilotstudie zur Immunisierung von wertvollen Zoovögeln zum Schutz vor einer West-Nil-Virus-Infektion**  
(F. Bergmann, FLI, Insel Riems)
- 10:15 **Die Rolle des deutschen Wirtschaftsgeflügels (insbesondere Gänse) im Transmissionszyklus von West-Nil-Virus**  
(H. Reemtsma, FLI, Insel Riems)
- 10:30 *Tee-/Kaffeepause*
- 11:00 **Toxocara spp. – einer der häufigsten Parasiten bei Hunden und Katzen in Deutschland: Entwicklung und Optimierung der Diagnostik**  
(Dr. P. Maksimov, FLI, Insel Riems)
- 11:15 **BVD-Diagnostik – Von der Ohrstanze zur Milchserologie?**  
(PD Dr. K. Wernike, FLI, Insel Riems)
- 11:30 **Die Milch macht's! Untersuchungen zum Einsatz von Sammel- und Tankmilch für die BVD-Überwachung**  
(J. Köster, Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf – Diagnostikzentrum, Aulendorf)
- 11:45 **10 x Riemser Diagnostiktage ... aus der Sicht der Veranstalter**  
(Prof. Dr. M. Beer, FLI, Insel Riems)
- 12:10 **10 x Riemser Diagnostiktage ... aus der Sicht von Untersuchungsämtern**  
(Dr. T. Miller, Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf – Diagnostikzentrum, Aulendorf)  
(Dr. W. Gaede, Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Stendal)
- 12:35–  
12:55 **Abschlussdiskussion**
- 12:55–  
13:00 **Schlusswort**  
(Prof. Dr. M. Beer, Leiter Institut für Virusdiagnostik)  
(PD Dr. K. Wernike, AVID-Vorstand)
- 13:00 *Mittagsimbiss*

## 10. RIEMSER DIAGNOSTIKTAGE

### Bakteriophagen und ihre Wirksamkeit – ein potenzielles Tool gegen die Antibiotikaresistenz bei Haustieren?

Eva Maria Kalbhenn, Katja-Sophia Klein, Wolfgang Beyer und Elisabeth Müller

Phagenzentrum, LABOKLIN GmbH & Co. KG, Steubenstraße 4, 97688 Bad Kissingen



Eva Maria Kalbhenn  
(© privat)

Viren sind die häufigste auf unserem Planeten vorkommende biologische Entität. Angaben zur Häufigkeit schwanken zwischen  $10^{31}$  und  $10^{32}$  virusähnlichen Partikeln. Nach heutigem Wissen sind Bakteriophagen – oder kurz Phagen – ausschließlich Bakterien und Archaeen befallende Viren und ihre Vielfalt ist schier unendlich.

Bereits im Jahre 1915 beschrieb der englische Bakteriologe Frederick W. Twort ein „ultramicroscopic virus“,

das als „transparentes Material“ Bakterien zerstören konnte, sich ohne diese aber nicht vermehren ließ und darüber hinaus in Infektionsversuchen mit Labortieren keinerlei Pathogenität aufwies (Frederick W. Twort, 1915). Zwei Jahre später nannte Felix d’Herelle (1873-1949) diese Bakterienkiller Bakteriophagen und erkannte, dass sich diese als Therapeutikum gegen Ruhr auslösende Bakterien einsetzen ließen (Felix d’Herelle, 1917). Später fand und nutzte er weitere Phagen gegen Typhus, Cholera, Pest und andere Infektionskrankheiten.

Die Vorteile der Anwendung von Bakteriophagen gegenüber Antibiotika sind (1) ihre spezies- oder isolatspezifische Wirkung (Normalflora bleibt verschont), (2) ihre Vermehrung solange der Bakterienwirt vorhanden ist und (3) die Möglichkeit der Mischung von Phagen mit verschiedenen Rezeptorspezifitäten zur Vermeidung von Resistenzbildung. Bislang wurden keine negativen Nebenwirkungen beim therapeutischen Einsatz von Phagen beschrieben.

Die zunehmende Verbreitung von pathogenen Bakterien mit multiplen Antibiotikaresistenzen (MREs) stellt ein enormes Problem für die Behandlung von bakteriellen Infektionen in der Human- und Veterinärmedizin dar. Nach Erhebungen des Europäischen Parlaments sterben gegenwärtig 25 000 Bürger pro Jahr in Europa an MREs. Diese Zahl könnte sich auf bis zu 10 Millionen Todesfälle bis 2050 steigern.

Haustiere und im Haus gehaltene Wildtiere können Träger von resistenten Zoonose-Erregern sein. Sie stellen damit ein Risiko für ihre Besitzer dar und sind gleichzeitig ein Reservoir für die Verbreitung der Resistenzen in der Umwelt. Beispiele sind Methicillin-resistente *Staphylococcus pseudintermedius* Stämme (auch bekannt als MRSP) oder Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), (Loponte et al., 2021).

Ein wichtiger Teil des One-Health-Konzepts ist die Erhaltung der Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt. Das Konzept bedingt einen verantwortungsvollen Einsatz von Antibiotika. Auch für die Veterinärmedizin bedeutet das die Reduktion des Antibiotikaeinsatzes auf ein unbedingt notwendiges Maß und den Einsatz möglicher Alternativen, gemäß den Guidelines der ISCAID (International Society for Companion Animal Infectious Diseases).

Beispiele für den Einsatz von Phagen in der Veterinärmedizin zur Bekämpfung häufiger Infektionen wie z. B. Salmonellose, Campylobacteriose, *E. coli*-Infektionen bei Hühnern sowie *Bordetella*- und *Pasteurella*-Infektionen beim Schwein oder auch zur Mastitis-Behandlung von Milchrindern wurden publiziert, mit teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Han et al., 2013; Zhang et al., 2015; Desiree et al., 2021; Loponte et al., 2021).

Phagen zur Anwendung in der Therapie sollten grundsätzlich

- in der Lage sein, ihren Zielkeim im Patienten zu erreichen,
- auf einem zur Pathophysiologie passenden Weg angewendet werden,
- hoch genug konzentriert sein und sich replizieren können,
- *in vitro* und *in vivo* stabil lytisch aktiv sein,
- ein breites Spektrum des Zielkeims lysieren,
- an möglichst unterschiedliche Rezeptorstrukturen des Zielkeims binden und
- keine „negativen“ Immunreaktionen induzieren.

Ziel unserer Studie am Phagenzentrum Laboklin war es, die *in-vitro*-Wirksamkeit verschiedener Bakteriophagen-Cocktails, welche im internationalen Handel für die Humanmedizin erhältlich sind, gegen Bakterienisolate von Haustieren aus der Routinediagnostik des Labors Laboklin GmbH & Co. KG (Bad Kissingen) zu bestimmen. Die untersuchten Proben stammen von verschiedenen Lokalisationen (Ohr, Harn, Wunde) von Pferden, Katzen und Hunden.



Die Studie konzentrierte sich auf *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp. sowie *Enterococcus* spp. und *Klebsiella* spp. Die Identifizierung der Bakterien-Spezies erfolgte mittels Maldi-ToF MS (Bruker Cooperation, USA), Antibiotikaresistenztests wurden mit dem Micronaut System durchgeführt und nach den Vorgaben des CLSI ausgewertet. Lediglich Stämme, die Resistenzen gegen mehr als 3 Antibiotikagruppen aufwiesen, wurden in die Testung eingeschlossen.

Für die Phagogramme standen sechs kommerziell hergestellte Bakteriophagen-Cocktails (Humanpräparate) von Eliava Biopreparations (Georgien, Tbilisi) zur Verfügung ([www.phage.ge/products](http://www.phage.ge/products)). Die Anfertigung von Phagogrammen (Abb.) erfolgt nach dem am Eliava-Institut etablierten Verfahren. Lysezonen wurden qualitativ bewertet. Fehlende Lyse wurde als Resistenz gegen die eingesetzten Phagen bewertet.



Abb.: Phagogramm auf *S. aureus* erstellt nach dem am Eliava-Institut etablierten Verfahren. Nummerierung beschreibt die verschiedenen getesteten Bakteriophagen-Cocktails des Eliava-Instituts. (1) Enco Bacteriophage, (2) Fersisi Bacteriophage, (3) Pyo Bacteriophage, (4) Intesti Bacteriophage, (5) Ses Bacteriophage, (6) Staph Bacteriophage. (© Phagenzentrum)

Die aktuellen Chargen der Bakteriophagen-Cocktails zeigten gegen bakterielle Isolate von Haustieren eine sehr unterschiedliche Effektivität. Eine gute Wirksamkeit von etwa 83 Prozent wurde gegen *P. aeruginosa* nachgewiesen. Geringere Wirksamkeiten von 35 Prozent wurden gegen *P. mirabilis* festgestellt. Die niedrige Wirksamkeit der

Bakteriophagen-Cocktails gegen *S. pseudintermedius* (5 Prozent), *S. felis* (30 Prozent), *K. pneumoniae* (10,5 Prozent), *K. oxytoca* (30,8 Prozent) und *K. variicola* (30,8 Prozent) war nicht überraschend, da spezifische Phagen gegen diese Erreger nicht als Bestandteil der Bakteriophagen-Cocktails angeführt waren. Die dennoch gefundenen Wirkungen beruhen wahrscheinlich auf einer spezies- bzw. gattungsübergreifenden Aktivität anderer Bakteriophagen-Bestandteile.

Weitere Arbeiten sind zwingend erforderlich, um spezifische Bakteriophagen-Cocktails mit an die endemisch bei uns vorkommenden Bakterien adaptierten Phagen zu entwickeln. Wünschenswert wären sowohl Präparate gegen aktuell auftretende monospezifische Infektionen als auch „broad spectrum“ Präparate. Diese müssen permanent aktualisierbar sein. Die aufwändige und kostenintensive Herstellung und Lizenzierung als „Medizinprodukt“ gemäß Richtlinie 2001/83/EC bzw. 2003/63/EC ist dafür ungeeignet. Künftig muss die Möglichkeit geschaffen werden, Phagenpräparate zur therapeutischen Anwendung an individuellen Patienten als Formula magistralis, also „Active Pharmaceutical Ingredient“ herzustellen und anzuwenden (Verbeke and Pirnay, 2022).

#### Literatur

- Desiree K, Mosimann S, Ebner P (2021). Efficacy of phage therapy in pigs: systematic review and meta-analysis. *J Anim Sci* 99. DOI: 10.1093/jas/skab157
- Felix d'Herelle (1917). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli
- Frederick W Twort (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses
- Han J E, Kim J H, Hwang S Y, Choresca C H, Shin S P, Jun J W, et al. (2013). Isolation and characterization of a Myoviridae bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis. *Res Vet Sci* 95, 758–763. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.06.001
- Loponte R, Pagnini U, Iovane G, Pisanelli G (2021). Phage Therapy in Veterinary Medicine. *Antibiotics* (Basel) 10. DOI: 10.3390/antibiotics10040421
- Verbeke G, Pirnay J-P (2022). European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. *Curr Opin Virol* 52, 24–29. DOI: 10.1016/j.coviro.2021.11.005
- Zhang J, Li Z, Cao Z, Wang L, Li X, Li S, et al. (2015). Bacteriophages as antimicrobial agents against major pathogens in swine: a review. *J Anim Sci Biotechnol* 6, 39. DOI: 10.1186/s40104-015-0039-7

## 10. RIEMSER DIAGNOSTIKTAGE

### Die Milch macht's!

## Untersuchungen zum Einsatz von Sammel- und Tankmilch für die BVD Überwachung

Swaantje Wenzel, Judith Köster, Karla Schneider,  
Hans-Jürgen Seeger, Thomas Miller

STUA Aulendorf – Diagnostikzentrum;  
Rindergesundheitsdienst Aulendorf der TSK BW



Swaantje Wenzel  
(© privat)

Die Bekämpfung der weltweit verbreiteten und zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Rinderkrankheiten zählenden Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) gilt als eine Erfolgsgeschichte der Tierseuchenbekämpfung in Deutschland. Nach Einführung der bundeseinheitlichen Bekämpfung basierend auf der „Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus“ (BVDV-Verordnung) 2011 konnte die Zahl der persistent

infizierten Tiere (PI-Tiere) im Jahr 2021 erstmalig auf eine zweistellige Anzahl gesenkt werden. In der Durchführungsverordnung (EU) 2022/2018 vom 14. Juli 2022 sind nun bereits elf Bundesländer mit dem Status „frei“ in Bezug auf BVD gelistet. Die bisherige und aktuelle Bekämpfungsstrategie beruht auf der virologischen Untersuchung aller Kälber (v.a. über Ohrstanzproben), um eine frühzeitige Erkennung und folglich die Eliminierung von PI-Tieren zu gewährleisten. Mit Inkrafttreten des EU-Tiergesundheitsrechtsaktes besteht seit 21. April 2021 der rechtliche Rahmen für serologische Überwachungsuntersuchungen mittels Blut- und Milchproben. Grundlage hierfür ist das seitdem geltende Impfverbot mit dem Ziel einer zunehmend antikörperfreien Rinderpopulation in Deutschland. Für die Prüfung der Umsetzbarkeit serologischer Überwachungsverfahren werden deutschlandweit Untersuchungen zur Eignung der Testsysteme und zur Abschätzung der Seroprävalenzen in den jeweiligen Bundesländern durchgeführt. Entsprechend der bereits etablierten logistischen Voraussetzungen wurden in Baden-Württemberg ab Januar 2020 Milchproben auf Antikörper gegen BVD untersucht.

### Antikörperstatus

Für die Erhebung des Antikörperstatus aller milchliefernden Betriebe wurden alle im Zuge der BHV-1 Untersuchung eingesandten Sammelmilchproben (Pool aus bis zu 50 Tieren) sowie ein Teil der für die Brucellose- und Leukose-Untersuchung über den Milchprüfing abgerufenen Tankmilchproben (Pool aus allen laktierenden Tieren des Betriebes) mittels ELISA untersucht (ID Screen BVD p80 Antibody Competition Fa. ID.vet; sensitives Protokoll). Im Zeitraum von Juni 2020 bis Juli 2022 waren dies rund 38.000 Proben von 5.382 aktuell milchliefernden Betrieben. Da Sammelmilchproben in Baden-Württemberg (BW) derzeit halbjährlich auf BHV-1 Antikörper untersucht werden, waren für den angegebenen Untersuchungszeitraum mindestens vier Proben zu erwarten. Betriebe mit weniger als drei Untersuchungen wurden von der Auswertung ausgeschlossen, oft handelte es sich dabei um Betriebsaufgaben. Eine höhere Anzahl von Beprobungen konnte durch die zusätzliche Untersuchung von Tankmilchproben für 51 Prozent der Betriebe mit maximal 50 Tieren ermöglicht werden. Da Betriebsübergaben in Baden-Württemberg mit der Vergabe einer neuen Betriebsnummer einhergehen, wurden Ergebnisse der jeweiligen Betriebsnummern zusammengeführt - wobei einzelne Abweichungen jedoch nicht völlig auszuschließen sind. Im Gesamten wurde für 5.209 Betriebe (97 Prozent der Stand September 2022 milchliefernden Betriebe in BW) ein vorläufiger serologischer BVD-Status erhoben (Abb. 1). Erwartungsgemäß wurden für den Großteil aller Betriebe im gesamten Beprobungszeitraum durchweg negative Ergebnisse ermittelt. Die Gesamtseroprävalenz für BVD-Antikörper (aus Impfung oder Infektion) in Baden-Württemberg beträgt 20,45 Prozent. Betriebe mit mehr als 50 Laktierenden und somit mehr als einer Probe pro Untersuchungszeitpunkt wurden dabei als positiv bewertet, sobald eine der Sammelmilchproben im ELISA den Cut-off von 35 S/P erreichte. Erwartungsgemäß lag der Anteil seropositiver Betriebe bei größeren Betrieben deutlich höher als bei kleinen Betrieben.

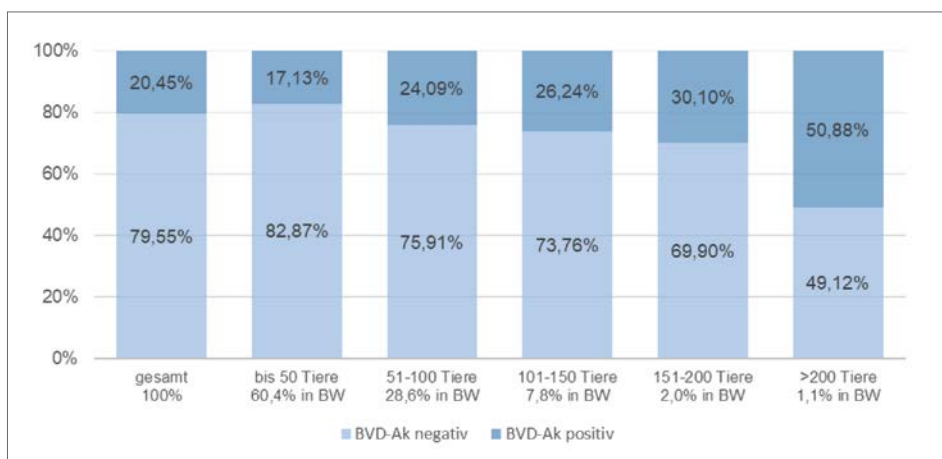


Abb. 1: Seroprävalenz gesamt BW und nach Betriebsgrößen

## Vergleich

Der Vergleich von Sammel- und Tankmilchergebnissen für Betriebe bis 50 Tieren zeigte eine deutliche Übereinstimmung der Ergebnisse mit  $K = 0,5$  - wobei hier das vollständige oder teilweise Fehlen einzelner oder mehrerer Tiere durch Trockenstehen, Behandlung, Abgang oder auch nur veränderte Milchleistung nicht eingerechnet ist (Abb. 2).

Weiterhin wurde die Übereinstimmung von Ergebnissen aus Sammelmilchpools und Tankmilch des Gesamtbestandes für verschiedene Betriebsgrößen ( $n = 1.519$  Betriebe mit Tankmilch bei  $> 50$  Tieren) verglichen. Die deutliche Übereinstimmung von Ergebnissen der Tankmilch mit den entsprechenden 50er- Sammelmilchpools für Betriebe bis 100 Tiere ( $K = 0,5$ ) legt eine Eignung von Milchpools oder Tankmilchproben mit einer Maximalzahl von bis zu 100 Tieren nahe (Abb. 3).

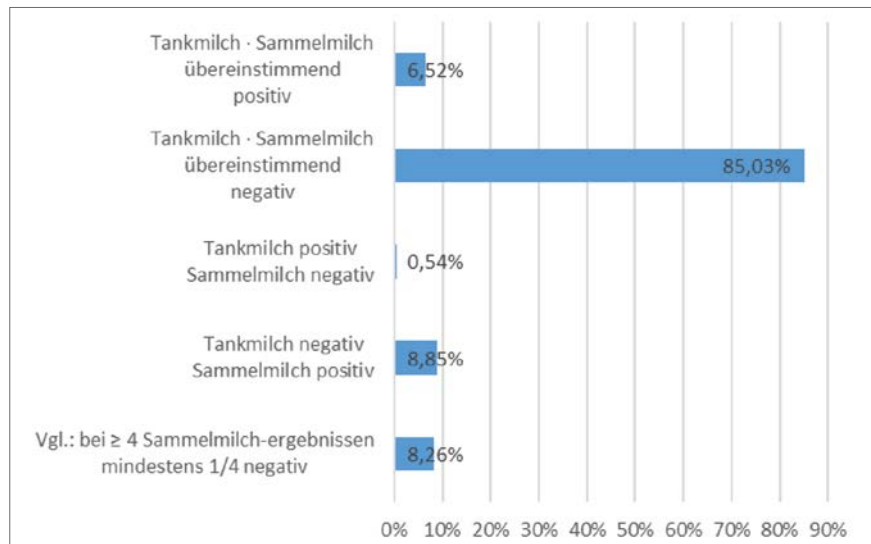


Abb 2: Sammelmilch und Tankmilch im Vergleich in Betrieben mit Tierzahl bis 50; vergleichend dazu der Anteil von seropositiven Betrieben, die bei mindestens vier Sammelmilch-Untersuchungen mindestens 1 abweichend negatives Ergebnis aufweisen (Trockensteher-Anteil)

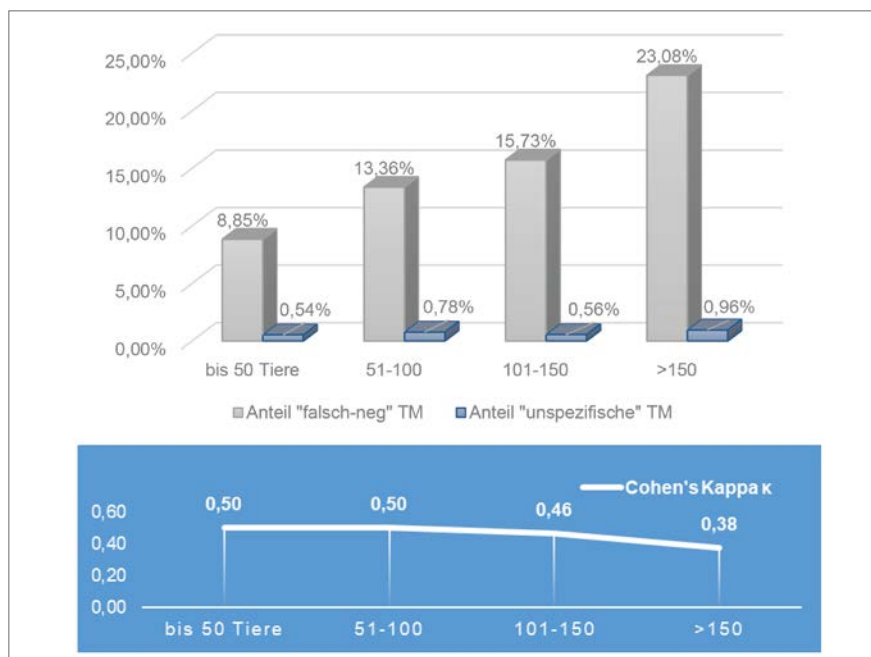


Abb. 3: Eignung von Tankmilchproben bzgl. verschiedener Bestandsgrößen

## Praktische Umsetzung

Für eine sichere Erkennung von Muttertieren potentieller PI Tiere über milchserologische Untersuchungen ist eine Frequenz von vier Milchproben im Jahr erforderlich. Unsere bisherigen Daten zeigen, dass die ergänzende Nutzung von Tankmilchproben in Betrieben mit der entsprechenden Tierzahl (bis 100) eine sichere serologische Überwachung von milchliefernden Beständen mit vergleichbar geringem logistischem Aufwand ermöglicht.

Um den Einsatz von Tankmilchproben hinsichtlich der logistischen Umsetzbarkeit sowie der Herausforderungen bezüglich Datenverarbeitung und -bereitstellung weitergehend zu untersuchen, wird am STUA Aulendorf Diagnostikzentrum seit Juli 2022 in einem weiteren Schritt eine repräsentative Stichprobe von Betrieben aus ganz BW über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr hinweg untersucht. Die Auswahl der Bestände erfolgte unter Beachtung der Betriebsgrößen sowie der geographischen Verteilung im Land. Von 1.400 Betrieben werden jeweils



## 10. RIEMSER DIAGNOSTIKTAGE

vier Milchproben im Abstand von rund drei Monaten untersucht. Hierfür werden zum einen wiederum die beiden Sammelmilchproben für die BHV-1 Überwachung zusätzlich auch auf BVD untersucht. Zum anderen werden alternierend dazu Tankmilchproben (Keimzahlproben) vom Milchprüfing für die jeweiligen Betriebe abgerufen und untersucht (Tab. 1). Für Betriebe mit über 50 zu Melkenden werden die einzelnen Sammelmilchproben gepoolt und als „simulierte Tankmilchproben“ zusätzlich untersucht. Dies ermöglicht den direkten Vergleich von kleineren und größeren Milchpools zum gleichen Zeitpunkt mit exakt gleicher Zusammensetzung.

Der Einsatz von Milchproben als non-invasives diagnostisches Probenmaterial bietet insbesondere über die

Nutzung von Synergien in der Überwachung anderer Tierseuchen (BHV-1, Brucellose, EBL) ein großes Potential für die Gewährleistung gesunder Milchviehbestände. Durch unsere Untersuchungen wollen wir zeigen, dass trotz der durch diverse Faktoren wie Anzahl trockenstehender Kühe, individuelle Milchleistung oder Ausfall aufgrund medizinischer Behandlung verursachten Variabilität von Sammel- und Tankmilchproben eine sichere serologische Überwachung von Milchviehbeständen mit dieser Methode erfolgversprechend ist. Sollten sich die in den Voruntersuchungen ermittelten Ergebnisse bezüglich der Nutzbarkeit größerer Milchpools bestätigen, wird insbesondere in Regionen mit kleineren bis mittleren Betriebsstrukturen der Einsatz von Tankmilchproben logistische und finanzielle Vorteile ermöglichen.

	über 200 Kühe	151–200 Kühe	101–150 Kühe	51 – 100 Kühe	bis 50 Kühe
RB Stuttgart	29	39	148	119	125
RB Karlsruhe	8	10	31	40	18
RB Freiburg	12	21	65	68	143
RB Tübingen	30	53	156	173	114
Gesamt (Anteil)	79 (100 %)	123 (100 %)	400 (91,7 %)	400 (31,1 %)	400 (16,2 %)

Tab.1: Aufteilung der Stichprobe (geographisch, Betriebsgröße); prozentualer Anteil an den für die Untersuchung verfügbaren Betrieben der jeweiligen Betriebsgröße in BW

## 25 Jahre hochpathogene aviäre Influenza der goose/Guangdong Linie – Rückblick und Auswirkungen auf Deutschland

Timm Harder, Anne Pohlmann, Christian Grund, Jacqueline King, Annika Graaf, Martin Beer

FLI, Institut für Virusdiagnostik, WOA, FAO und Nationales Referenzlabor für Aviäre Influenza (AI)/Geflügelpest & Labor für Datenkurierung

Ganzjährige Nachweise von hochpathogenen aviären Influenzaviren (HPAIV) in europäischen Wildvogelpopulationen führten in diesem Jahr erstmalig zu schweren, zum Teil bestandsgefährdenden Verlusten bei koloniebrütenden Seevögeln während der Sommermonate. Dies bedeutet eine weitere Verschlechterung der epidemiologischen HPAI Situation. Das aktuelle HPAIV vom Subtyp H5N1 war medial vor allem durch Massensterben sichtbar geworden, aber Einzelfunde in diversen Wildvogelspezies belegen den ganzjährigen HPAI-Infektionsdruck in der Wildvogelpopulation vor allem im nördlichen und zentralen Europa. Aufgrund dieses hohen Infektionsdrucks waren Geflügelhaltungen über den Sommer vor allem in Nordsee-Anrainerstaaten von Ausbrüchen betroffen, die in einigen Ländern an die Kapazitätsgrenzen einer tierschutzgerechten Räumung und ordnungsgemäßen Entsorgung infizierter Bestände führten. HPAI bei Wildvögeln und Geflügel in Europa ist keineswegs ein neues Phänomen: Seit 2006 wurden Fälle und Ausbrüche allerdings überwiegend mit einer saisonalen Ausprägung in den Herbst- und

Wintermonaten nachgewiesen (Abb.). Die Saisonalität war geprägt durch wiederholte Einschleppungen des Virus mit migrierenden Wildvögeln, die auf dem Herbstzug aus östlich gelegenen Regionen Eurasiens einflogen. Mit dem Frühjahrzug dieser Vögel in entgegengesetzte Richtung bzw. mit dem Beginn der Brutsaison verschwanden die Viren wieder aus Europa, deren Ursprung tatsächlich im südöstlichen Asien liegt. Dort trat 1996/97 erstmals ein HPAI H5N1 Virus in einer Gänsehaltung in der chinesischen Provinz Guangdong auf. Heute sehen wir die Nachkommen dieses Virus, die als goose/Guangdong (gs/GD) Linie bekannt wurden, in mittlerweile fast vollständiger globaler Zirkulation. Lediglich Mittel- und Südamerika sowie Australien und der antarktische Kontinent sind bisher verschont geblieben. Übertragungen dieses Virus aus seinen primären Quellen in südostasiatischen Wassergeflügelhaltungen auf migrierende Wildvogelpopulationen mobilisierte HPAIV H5N1 in erheblichem Maße und eröffnete Übertragungs- und Verbreitungsoptionen über weite geografische Räume hinweg. Sekundäre Übertragungen zwischen Geflügelhaltungen, vielschichtige Handelsbeziehungen sowie systeminhärente Schwierigkeiten in der Tierseuchenbekämpfung sicherten den Viren einen bis heute aufrechterhaltenen endemischen Status in Geflügel in einigen südostasiatischen Ländern und erlaubten frequente neuerliche Virusausstragungen in Wildvogelpopulationen seit 2003.

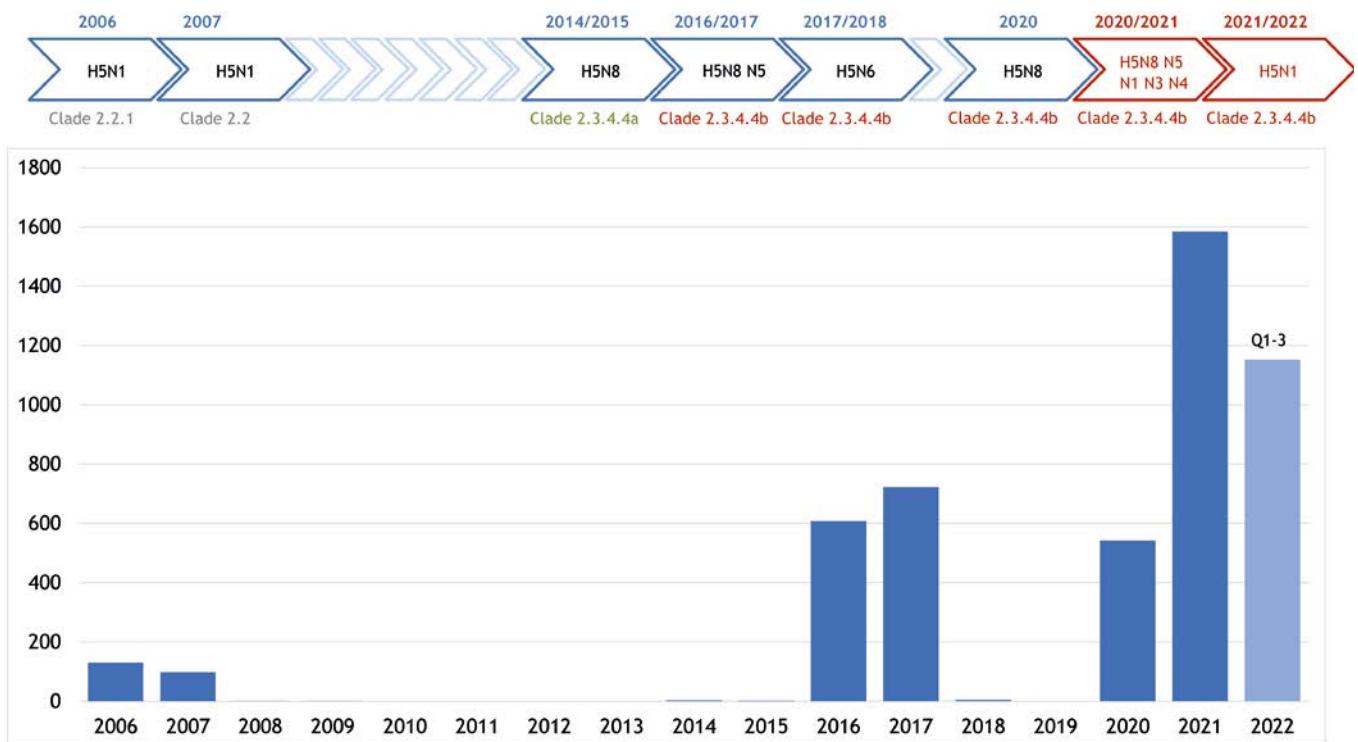


Abb.: Ausmaß, Subtypen und phylogenetische Einordnungen hochpathogener aviärer Influenzaviren der gs/GD Linie in Wildvögeln und Geflügel in Deutschland seit 2006.

Die genetische Flexibilität von Influenzaviren ermöglicht u.a. den Austausch von genetischem Material zwischen verschiedenen Influenzaviren, wenn sie dieselbe Zelle infizieren. Da Wildvögel das Reservoir niedrig pathogener aviärer Influenzaviren (LPAIV) darstellen, ergaben sich mit den HPAIV H5N1 Austrägen aus den Geflügelhaltungen in Asien vielfältige Entwicklungsmöglichkeiten für die Viren. Aber auch niedrig pathogene AIV, die im Geflügel in Asien bereits endemisch waren – insbesondere der Subtyp H9N2 – trugen in entscheidendem Maße zur Evolution von HPAIV der gs/GD Linie bei.

In den medialen Fokus gerieten diese Infektionen seit etwa 2005, als in den HPAI Endemiegebieten Asiens und des Nahen Ostens vermehrt menschliche Infektionen mit diesen Viren festgestellt wurden. In den berichteten Fällen endete der Krankheitsverlauf in nahezu 40 Prozent tödlich. Umfangreiche Bekämpfungsaktionen in diesen Regionen fokussierten hauptsächlich auf Impfungen des Geflügels, die dort, wo diese Kampagnen streng kontrolliert durchgeführt wurden, auch zu einer merklichen Reduktion der Menge des zirkulierenden Virus geführt hatten. Deutlichster Ausdruck des Erfolges war der starke Rückgang humaner HPAIV Infektionen. Die langjährigen Erfahrungen mit Impfungen zeigten allerdings auch, dass Vakzinierungen im Geflügel allein nicht ausreichend waren, um eine Eradikation der gs/GD Viren zu erreichen.

In Europa und Deutschland blieb jedoch die HPAIV Impfung von Geflügel als präventive Maßnahme bis vor kurzem verboten. Stattdessen wurde die Strategie der frühzeitigen Detektion von Viruseinbrüchen in Geflügelhaltungen, der Isolierung von Verdachtsbeständen, der Räumung und unschädlichen Beseitigung von Beständen nach amtlicher Feststellung des Ausbruchs sowie der Entschädigung der Halter erfolgreich betrieben. Mit der jüngst sich ändernden

epidemiologischen Lage in Europa aufgrund der endemischen Einnistung von gs/GD HPAIV in europäischen Wildvogelpopulationen muss jedoch dieses bewährte Vorgehen der Seuchenbekämpfung überdacht und erweitert werden: Adäquate Präventions- und Bekämpfungsmaßnahmen zum Schutz der Wildvögel gegen HPAIV bestehen derzeit kaum. Von einem weltweit anhaltenden HPAI-Infektionsgeschehen bei Wildvögeln ist auszugehen. Die stringente Bekämpfung der Infektion im Geflügel stellt nunmehr auch in Europa und Deutschland eine ganzjährige Herausforderung dar, um Geflügelbestände zu schützen, Austräge in Wildvogelpopulationen sowie speziesübergreifende Infektionen von Säugetieren (Schweine!) und des Menschen zu verhindern. Erweiterte Konzepte der Prävention, insbesondere die Impfung des Geflügels gegen HPAI als flankierendes Werkzeug der Infektionseindämmung, werden daher zukünftig auch in Europa erwogen werden müssen. Dies kann insbesondere für spezifische Sektoren in Deutschland wie z.B. Freilandbetriebe (Legehennen, Gänseeltern) oder Mastputenhaltungen relevant werden. Die damit verbundene erforderliche Surveillance in Geflügelbetrieben, die impfen, wird zusätzliche diagnostische Belastungen induzieren, die bei der Planung amtlicher diagnostischer Kapazitäten, auch im FLI, zu berücksichtigen wären. Weiterhin aufrechtzuerhalten bleibt der schnelle und treffsichere HPAIV Nachweis. Fortgesetzte Anpassungen in den diagnostischen Verfahren sind zu erwarten, um auch weiterhin den Nachweis, die Sub- und Pathotypisierung von Viren aus Verdachtsproben parallel binnen weniger Stunden zu erlauben. MinION-basierte Sequenzierungsverfahren und phylogenetische Analysen helfen in der epidemiologischen Aufarbeitung der Infektionsdynamik. Alle diagnostischen Bemühungen fußen allerdings auf der guten Zusammenarbeit aller beteiligten Parteien und einer eingeschliffenen Logistik.

# Die HPAIV Genotypen in Deutschland: Immer neu und immer aktuell

Anne Pohlmann

FLI, Institut für Virusdiagnostik, Labor für Datenkurierung



Anne Pohlmann  
(© W. Maginot, FLI)

In den Jahren 2020-2022 hat das hochpathogene aviäre Influenzavirus (HPAIV) Subtyp H5 in den europäischen und nord-amerikanischen Wildvogel- und Geflügelpopulationen eine Enzootie von noch nie dagewesenem Ausmaß verursacht. Der derzeit zirkulierende Genotyp entstand im Sommer 2020 und hat sich im Winter 2020/2021 zu einer bisher unbekanntem genetischen Vielfalt von Genotypen weiterentwickelt.

Diese Entwicklung setzte sich fort mit einer ungewöhnlichen Präsenz des Virus im Sommer 2021 und einer wiederum von hoher genetischer Variabilität geprägten HPAIV Saison im Winter 2021/2022. Auch im Sommer 2022 war das Virus kontinuierlich in Wildvogel- und Geflügelpopulationen nachweisbar.

Sequenzinformationen sind ein entscheidendes Mittel, um die genetische Variabilität der zirkulierenden Viren abzubilden, Eintrag und Verbreitung von Viren mit Hilfe

molekular-epidemiologischer Methoden zu verfolgen und die Entstehung und Verbreitung neuartiger Influenzaviren zu beschreiben. Am FLI werden Stichproben der positiv getesteten HPAIV Proben sequenziert und phylogenetisch analysiert. Ergebnisse dieser Analysen werden kontinuierlich in einem Gesamtüberblick zusammengefasst, aktualisiert und sind öffentlich abrufbar unter:

DOI: 10.5281/zenodo.6838094

Auf der Basis aktueller Daten repräsentieren die Grafiken wochengenaue genetische Analysen von Fällen bzw. Ausbrüchen hochpathogener aviärer Influenza (HPAI) des Subtyps H5 bei Wildvögeln und Geflügel in Deutschland. Hierbei werden Sequenzinformationen ausgewertet und mit Daten aus dem Tierseuchennachrichtensystem und dem Institut für Virusdiagnostik des FLI zusammengeführt. Innerhalb des HPAI Subtyps H5 werden auf der Basis von Sequenzvergleichen verschiedene Genotypen unterschieden, die entsprechend farbig gekennzeichnet sind. Die geografische Verteilung einzelner Fälle, die jeweilige Anzahl an Sequenzen der Genotypen, ihr zeitlicher Verlauf und ihre Aufteilung auf die verschiedenen HPAIV Subtypen bezogen auf ihr Vorkommen bei Wildvögeln, Geflügel und gehaltenen Vögeln werden gemeinsam gezeigt. Mit Hilfe detaillierter phylogenetischer Analysen lassen sich weiterhin die Sequenzen und damit die jeweiligen Fälle bzw. Ausbrüche gemeinsamen Clustern zuordnen.

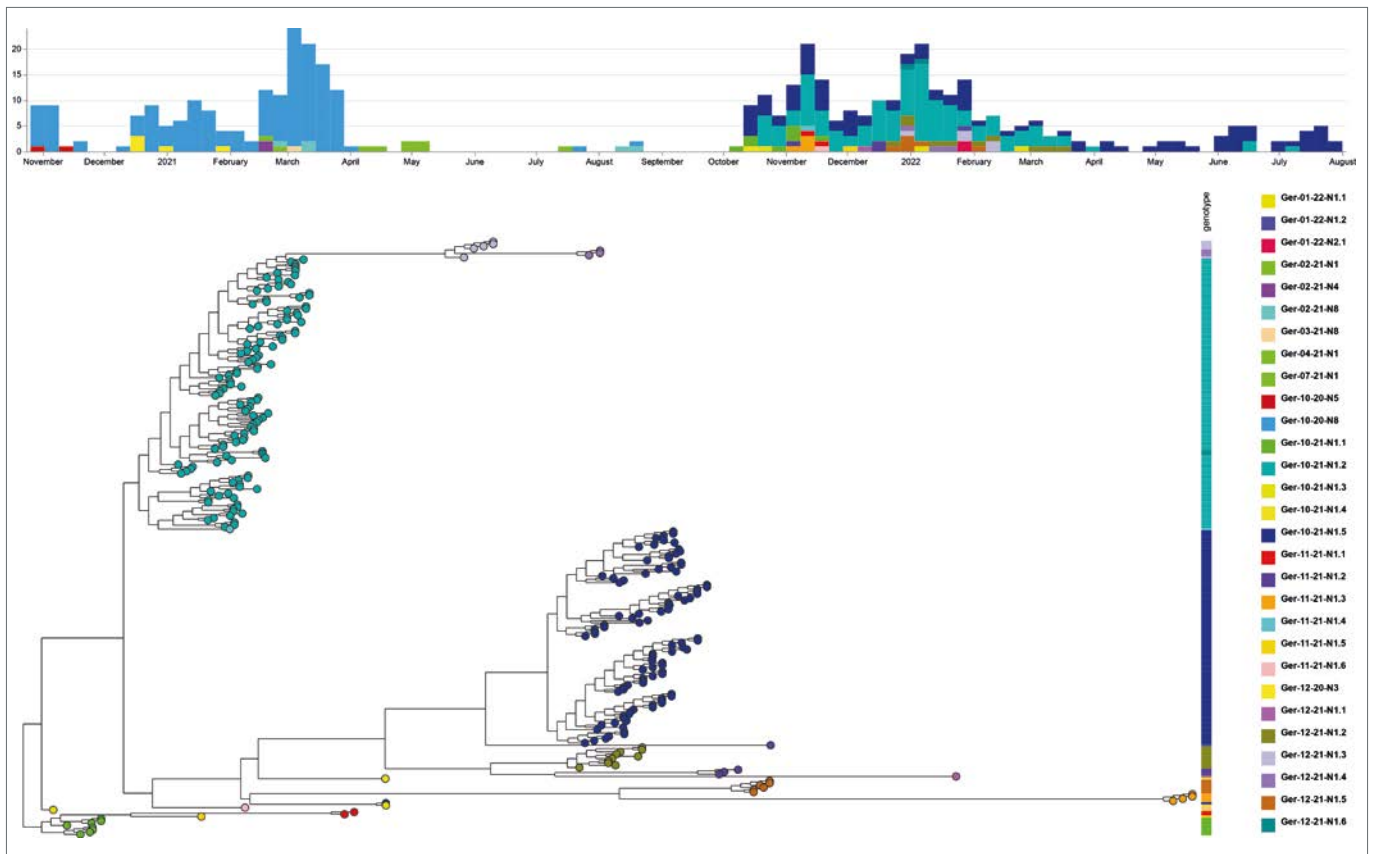


Abb.: HPAIV Genotypen von 2020 bis 2022 als wochengenaue zeitliche Anzahl der analysierten Sequenzen und eine phylogenetische Analyse von H5N1 Sequenzen aus 2021/2022.



# COMPARE-Ringversuch für NGS-basierte Diagnostik von FFPE-Material

Dirk Höper und Claudia Wylezich

FLI, Institut für Virusdiagnostik, Labor für NGS und Microarray-Diagnostik

Im Rahmen des COMPARE-Projekts wurden erstmals Ringversuche für die NGS-basierte Diagnostik durchgeführt, um Standards dafür zu erarbeiten und den routinemäßigen Einsatz dieser Methode zur Pathogendetektion zu ermöglichen. Im LabLoeffler 18 haben wir bereits über zwei dieser Ringversuche berichtet (Höper und Wylezich, 2019, Heft 1) und möchten nun die wichtigsten Ergebnisse des dritten COMPARE-Ringtestes (FFPE Ring Trial) vorstellen. Dieser wurde 2019 vom Labor für NGS am FLI mit Unterstützung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover organisiert. Der Ringversuch bestand aus einem Labor- und einem bioinformatischen Analyse-Teil.

Den elf teilnehmenden Arbeitsgruppen wurde Formalinfixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE-) Probenmaterial von zwei Fallstudien zugeschickt: 1. Leber eines Wildkaninchens, infiziert mit einem einzelsträngigen RNA-Virus (Rabbit haemorrhagic disease virus 2, RHDV-2) und 2. Leberprobe eines Fohlens, infiziert mit einem doppelsträngigen DNA-Virus (Equine herpesvirus 1, EHV-1). Abgefragt wurde anschließend neben der Zusammenfassung und diagnostischen Einschätzung der Ergebnisse auch die Vorerfahrung mit der Bearbeitung von FFPE-Material sowie exakte Angaben zu Prozessierung und Analyse der Proben.

Alle Teilnehmer gaben an, NGS-Methoden routinemäßig anzuwenden, aber nur drei von ihnen hatten in diesem Kontext bereits Erfahrung mit FFPE-Material. Zehn Teilnehmer waren erfolgreich in der Bearbeitung und Sequenzierung des Testmaterials und detektierten mindestens eines der Targetviren. Demnach kamen die Teilnehmer mehrheitlich gut zurecht mit dem besonderen Ausgangsmaterial. Die kommerziell verfügbaren Extraktions-Kits zeigten tendenziell eine gute Performance. Der für Erfolg und Qualität der Extraktion entscheidende Schritt besteht in der Art der anfänglichen Deparaffinisierung und dem de-crosslinking der Probe (Abb.).

Die größten Unterschiede in den Ergebnissen wurden allerdings nicht durch die Wahl des Extraktionskits hervorgeru-

fen, sondern durch die Wahl der verwendeten Nukleinsäure und die weitere NGS-Prozessierung. Hinsichtlich der Nukleinsäure ergab eine Gesamtanalyse aller eingereichten Datensätze, dass im Fall eines RNA-Virus in der Probe die gemischte Weiterbearbeitung von RNA und DNA zum Verlust des Virus-Signals im Datensatz führt (Abb. links). Im Gegensatz dazu führte die Bearbeitung der reinen RNA-Fraktion mit einer Ausnahme (Teilnehmer 4, hier war der erzeugte Datensatz zu klein, um angesichts des Virusgehaltes der Probe das Virus zu detektieren) immer zur Detektion des RNA-Virus. Und auch ein replizierendes DNA Virus kann im RNA-basierten Datensatz detektiert werden (Abb. rechts).

Bezüglich der NGS-Prozessierung zeigte sich, dass die Addition eines rRNA-Depletion-Schrittes im NGS-Workflow zur Verstärkung des Virus-Signals führen kann (Teilnehmer 2). Hingegen führte der Einsatz eines modifizierten SISPA-Protokolls (Reyes GR, Kim JP (1991). Mol Cell Probes 5: 473-481) für die cDNA-Herstellung zwar zu einer Anreicherung des Virus-Signals aber zu einer verzerrten Genom-Abdeckung und Verschlechterung der Datenqualität (Teilnehmer 3).

Insgesamt konnten wichtige Erkenntnisse aus dem FFPE-Ringversuch gezogen werden (Höper et al., in Vorbereitung). Darauf basierend wurden am FLI weitere Kit-Vergleiche zur Nukleinsäure-Extraktion aus diesem speziellen Material durchgeführt (mittels truXTRAC FFPE total NA Kit, Covaris; Agencourt RNAdvance Tissue Kit, Beckman Coulter; Formapure Total DNA & RNA Extraction Kit, Beckman Coulter; miRNAeasy FFPR Kit, Qiagen). Die Optimierung und Validierung des besten Extraktions-Protokolls ist derzeit in Bearbeitung. Anschließend kann das optimierte Protokoll für älteres und archiviertes Probenmaterial angewendet werden, um die Phylogenie und Evolution viraler Erreger zu studieren.

Noch ein Hinweis in eigener Sache: das Labor für NGS am FLI (Labor für NGS-basierte Pathogencharakterisierung und Tierseuchendiagnostik) hat ein neues Formular für die Ein-sendung von Probenmaterial entwickelt (F 14-3), welches für zukünftige Einsendungen genutzt werden muss und zur Verfügung gestellt werden kann (Anfragen und Einsendungen an: NGS.Riems@fli.de).

Link zum COMPARE-Projekt: [www.compare-europe.eu](http://www.compare-europe.eu)

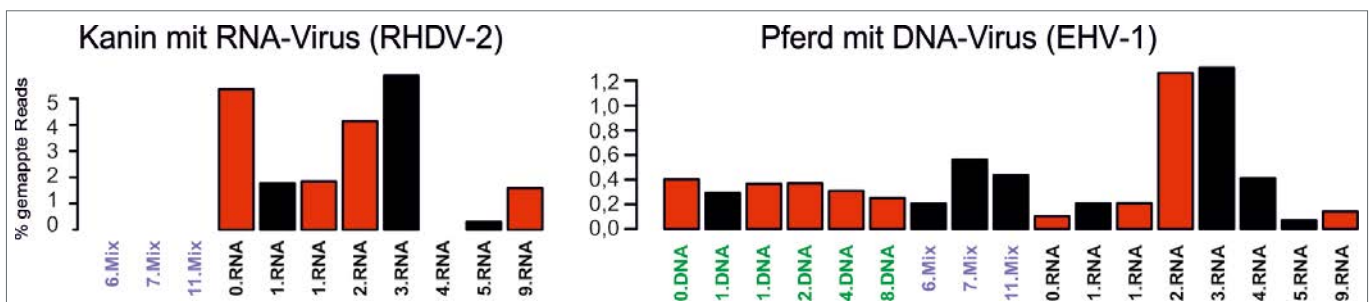


Abb.: Ergebnisse des FFPE-Ringtestes für 11 Teilnehmer (s. Nummerierung a. d. X-Achse; dort auch die genutzte Nukleinsäure, DNA, RNA oder ein Mix aus DNA und RNA; P0 = Pilotstudie, P8 bearbeitete nur DNA, P10 hat kein Ergebnis eingereicht). Angegeben ist die prozentuale Readanzahl des Targetvirus (RHDV-2 oder EHV-1) erhalten mittels Mapping-Analyse gegen die Referenzsequenz (erstellt aus nativem Material). Für die Rot-markierten Datensätze wurde Deparaffinisierung und de-crosslinking mittels spezieller Deparaffinisierungslösung (Qiagen) durchgeführt, während für die Schwarz-markierten Datensätze mit anderen Substanzen (meist Xylo) deparaffinisiert wurde.

# Auswertung des nationalen Ringtests zur Diagnostik von viralen Fischseuchen-Erregern

Heike Schütze, Sven M. Bergmann und Uwe Fischer

FLI, Institut für Infektionsmedizin

Gemäß §27 des Gesetzes zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen führten die nationalen Referenzlabore (NRL) für gelistete Fischseuchen 2022 den jährlichen Ringversuch zur Diagnostik der viralen Erreger der als Kategorie C+D+E bzw. E gelisteten Krankheiten Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS), infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN), Infektiöse Anämie der Lachse (ISA) bzw. Koi-Herpesvirus Infektion (KHV-I) durch.

## Aufgabenstellung

Der nationale Ringtest FLI\_RT2022 umfasste insgesamt fünf Proben. Alle Proben enthielten jeweils 2 x ca. 1 ml virushaltiges bzw. nicht virushaltiges Zellkulturmaterial. Ziel des Ringvergleichs war die Diagnostik der o.g. Erreger auf Grundlage der Delegierten Verordnungen EU 2020/687 und EU2020/689 und der amtlichen Methodensammlung des FLI. Die teilnehmenden Labore wählten dabei selbst, ob der Erregernachweis mittels Zellkulturverfahren und anschließender Bestätigung durch immunhistochemische Techniken und/oder durch Genomnachweis des Erregers durchgeführt wurde.

## Teilnahme

Insgesamt nahmen 23 in Deutschland amtlich benannte Labore sowie ein Labor aus Österreich teil. Von den 24 Teilnehmenden beteiligten sich 23 Labore an der Diagnostik

der Kategorie E-Seuche KHV-I. Die Nachweisverfahren für Erreger der IHN und VHS (Kategorie C+D+E) sind in 23 Laboren etabliert. Obwohl Deutschland bislang frei von der Kategorie C-Seuche ISA ist, führten 19 Labore Nachweisverfahren zur Diagnostik des ISA-Erregers durch.

## Ergebnisse

Die Erreger wurden von allen Teilnehmenden korrekt diagnostiziert. Die Identifizierung erfolgte überwiegend mittels Genomnachweis in der quantitativen (RT-)PCR ((RT)-qPCR). Mehr als die Hälfte der Labore isolierte die Erreger IHNV/ VHSV in der Zellkultur. Zur Bestätigung des positiven Erreger- bzw. Genomnachweises nutzten einige Labore konventionelle Amplifizierungsverfahren einschließlich der Sequenzierung. Tabelle 1 gibt einen Überblick zu den angewandten Techniken.

## Erregernachweis mittels Zellkultur

IHNV und VHSV (Ampulle 5) wurden in 15 von 23 Laboren in der Zellkultur isoliert und anschließend im Immunfluoreszenztest (IFT, 12 Labore), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA, vier Labore) identifiziert. Den Virusgehalt ermittelten acht Teilnehmer parallel auf verschiedenen Zelllinien. Dabei wurden die empfohlenen Zelllinien der Elritze CCLV Rie 57 (FHM) von einem Labor, CCLV Rie 173 (EPC) von acht Laboren und der Regenbogenforelle CCLV Rie 38 (RTG-2), 686 (RTG-2/f) von sieben Laboren bzw. des Sonnenbarsches CCLV Rie 290 (BF-2) oder 88 (RT/F) von drei Laboren verwendet. In Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie variieren die ermittelten Titer

Ampulle	1	2	3	4	5	
Spezies	Karpfen	Karpfen	Lachs	Lachs	Forelle	
Ampulleninhalt	KHV	negativ	negativ	ISAV-HPRdel*	IHNV	VHSV
Teilnehmer	23	23	19	19	23	23
Virusnachweis	4	-	-	7	15	15
Zellkultur	4	-	-	7	15	15
Titer	3	-	-	3	9	9
IFT	2	-	-	6	12	12
ELISA	-	-	-	-	3	3
PLA	1	-	-	1	1	1
Elektronenmikroskopie	1	-	-	5	4	4
Genomnachweis	23	-	-	17	23	23
(RT-)qPCR	22	-	-	15	20	22
(RT-)PCR	8	-	-	11	9	8
Sequenzierung	6	-	-	7	5	4

Tab. 1: Teilnahme an der Diagnostik viraler Fischseuchenerreger im Rahmen des FLI\_RT2022. Aufgeführt ist die Anzahl der Teilnehmer mit positivem Erregernachweis und den angewandten Methoden. - negativ bzw. nicht durchgeführt; \* Die Ergebnisse „ISAV“ ohne Differenzierung der HPR-Deletion bzw. „Orthonyxovirus“ wurden als positiv gewertet.

zwischen  $8,43 \times 10^4$  auf der CCLV Rie 290 (BF-2) und  $1,08 \times 10^6$  auf der CCLV Rie 173 (EPC). Laut NRL wurde der Virusgehalt für die IHN- und VHSV-Doppelinfection in Ampulle 5 unter Verwendung der Zelllinien EPC sowie BF-2 mit  $5,00 \times 10^5$  und RTG-2 mit  $3,41 \times 10^5$  ermittelt. In der Zellkultur wäre eine Differenzierung der viralen Erreger von Ampulle 5 jeweils nur nach Neutralisierung von IHN- bzw. VHSV möglich.

Insgesamt beteiligten sich 19 der 24 teilnehmenden Labore an der Diagnostik von ISAV. Der Erreger der Ampulle 4 (ISAV-HPRdel) wurde erfolgreich von sieben Laboren in der Zellkultur (CCLV Rie 926, ASK bzw. CCLV Rie 489, SHK) isoliert und mittels IFT (5 Labore), ELISA (1 Labor) oder Elektronenmikroskopie (5 Labore) bestätigt. Die übermittelten Titer korrelieren mit den Angaben des NRL (Abb. 1). Nach Infektion mit dem Inhalt der Ampulle 1 (KHV) wurde von vier Laboren in der Zellkultur ein zytopathischer Effekt (CPE) festgestellt und anschließend mittels IFT (zwei Labore) und Peroxidase-linked Immunosorbent Assay (PLA) bzw. durch elektronenmikroskopische Analyse (jeweils ein Labor) als KHV identifiziert. Die übermittelten Titer (zwei Labore) entsprechen der Titerangabe des NRL (Abb. 1).

### Genomnachweis

Von den teilnehmenden Laboren wurde vorwiegend die (RT)-qPCR zum Nachweis von KHV-, ISAV-, IHN- und VHSV-Genom eingesetzt (Tab. 1). Die übermittelten cq-Werte sind in Abbildung 2 graphisch zusammengefasst. Die Genome von IHN- und VHSV (Ampulle 5) wurden von allen Teilnehmenden korrekt nachgewiesen. Zur Anwendung kamen die RT-qPCR zum Nachweis von IHN-Genom in 20 bzw. von VHSV-Genom in 22 Laboren. Der cq-Mittelwert beträgt ca. 24 sowohl für IHN- als auch VHSV. Die maximale Differenz zum Mittelwert beträgt ~ 3 für IHN- bzw. 4,9 für VHSV. Generell

besteht eine sehr gute Korrelation zwischen den ermittelten Virustitern und den cq-Werten, insbesondere auch bei den Laboren, die beide Methoden durchgeführt haben. Die RT-PCR wurde in neun Laboren zum Nachweis von IHN- bzw. in acht Laboren zur Identifizierung von VHSV eingesetzt. Methoden zum Genomnachweis des ISAV sind in 17 Laboren etabliert.

15 Labore führten die RT-qPCR durch. Die übermittelten cq-Werte variieren zwischen 19,9 und 30,6. Bezogen auf den errechneten Mittelwert von 23,6 sind die Unterschiede der ermittelten cq-Werte zum Teil erheblich. Die meisten Labore ermittelten jedoch für das ISAV-Genom einen cq-Wert von 21-24, was einer maximalen Abweichung des Virusgehaltes um den Faktor 8 entspricht. Die Identifizierung des ISAV-Genoms mittels RT-PCR erfolgte in elf Laboren. Sieben teilnehmende Labore identifizierten nach Sequenzierung des entsprechenden RT-PCR-Produktes den Erreger der gelisteten Erkrankung ISA, ISAV-HPRdel. An der Identifizierung des Erregers der KHV-I beteiligten sich alle 23 Labore mit Erfolg. Das entsprechende Genom wurde in 22 Laboren in der qPCR und in acht Laboren in der PCR korrekt nachgewiesen. Der KHV-Genomnachweis wurde von sechs Laboren durch Sequenzierung des PCR Produktes bestätigt. Die übermittelten cq-Werte unterscheiden sich untereinander maximal um etwa 5,8. Bezogen auf den Mittelwert von 21,27 beträgt die Differenz zum Minimalwert 2,62 und zum Maximalwert 3,15. Dies entspricht in etwa einer Abweichung des Virusgehaltes (TCID<sub>50</sub>) um den Faktor 10.

### Fazit

Die Ergebnisse des diesjährigen Ringtests bestätigen somit erneut die hohe Fachkompetenz der benannten Labore.

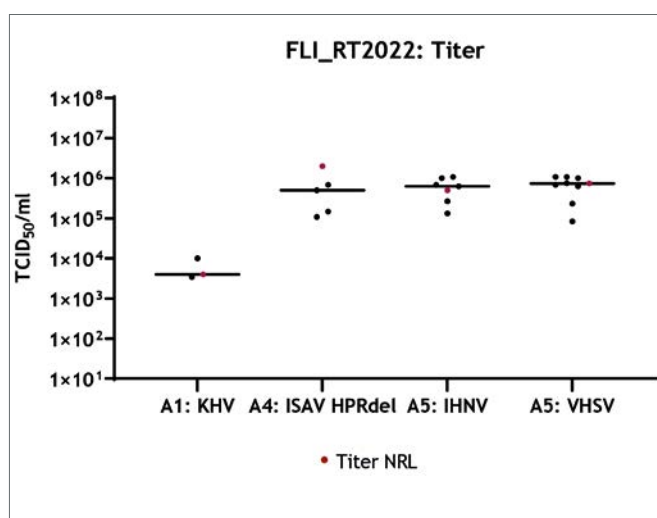


Abb. 1: Bestimmung des Virusgehaltes (Titer) der Ringtestproben. Jeder Punkt entspricht dem jeweils höchsten Titer, der von den teilnehmenden Laboren auf den entsprechend empfänglichen Zellen bestimmt wurde. Rot gekennzeichnet sind die ermittelten Werte des zuständigen NRL.

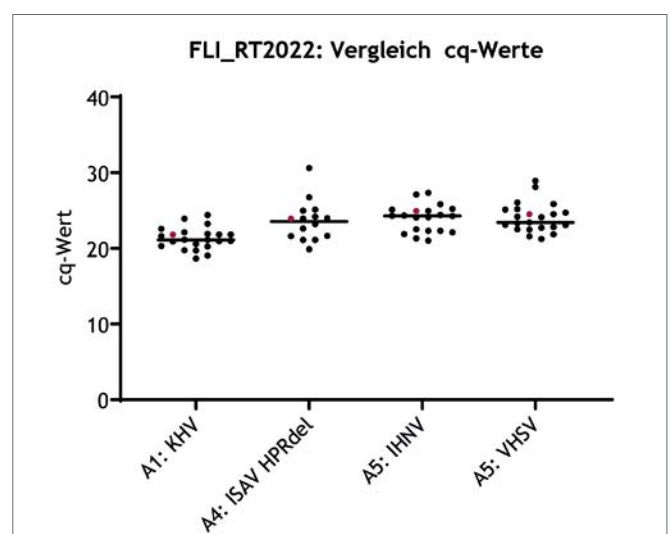


Abb. 2: Bestimmung der Erreger-Genomlast (cq-Wert) der Ringtestproben. Jeder Punkt entspricht dem übermitteltem cq-Wert je Labor. Rot gekennzeichnet sind die ermittelten Werte des zuständigen NRL.



# Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung 2021 zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von MAP in Rinderkotproben

Heike Köhler

FLI, Institut für molekulare Pathogenese, Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose



Heike Köhler  
(© M. Pfau, FLI)

Das NRL für Paratuberkulose am FLI führte 2021/2022 die fünfte Laborvergleichsuntersuchung (LVU) zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderkotproben durch. Die Methode für den kulturellen Nachweis von MAP in Kotproben ist in der Amtlichen Methodensammlung niedergelegt. Für den Direktnachweis von MAP-Genom in Kotproben stehen derzeit sechs in Deutschland zugelassene qPCR-Kits zur Verfügung (s. Liste der zugelassenen Mittel auf der Homepage der Zulassungsstelle).

An der Vergleichsstudie nahmen 28 Labore aus dem In- und Ausland sowie das NRL für Paratuberkulose selbst teil. Die teilnehmenden Labore waren aufgefordert, die bereitgestellten Proben mit dem in ihrem Haus etablierten Kulturverfahren und/oder Direkt-PCR-Verfahren zum Nachweis von MAP in Kotproben zu untersuchen. Für die Studie wurden elf MAP-positive und neun MAP-negative native Kotproben von Rindern vorbereitet. Die positiven Proben stammten von Rindern, bei denen in mindestens einer vorangegangenen Untersuchung MAP kulturell im Kot nachgewiesen worden war. Die MAP-negativen Proben

stammten von Tieren aus Paratuberkulose-unverdächtigen Beständen. Es wurden positive Proben mit hoher (n=3), mittlerer (n=5) und schwacher Belastung (n=3) mit MAP zur Verfügung gestellt.

## Methodik des kulturellen Erregernachweises

Insgesamt 18 Labore führten den kulturellen Erregernachweis und 27 den Direktnachweis von MAP mittels PCR durch. Seit der letzten Laborvergleichsuntersuchung, die 2016/2017 stattfand, wurde die Vorgehensweise der Labore bei der kulturellen Anzucht von MAP einheitlicher. Die Dekontamination der Proben erfolgte überwiegend im Sedimentationsverfahren, es wurden 2-5 Kulturröhrchen pro Probe eingesetzt und die Kulturdauer betrug zwischen 12 und 20 Wochen. Die Speziesbestätigung von MAP erfolgte in der Mehrzahl der Labore mittels PCR und lediglich in einem Labor mittels MALDI-TOF. Zwei Labore führten dazu ausschließlich den Nachweis der Mykobaktin-Abhängigkeit durch.

## Ergebnisse des kulturellen Erregernachweises

68 Prozent der teilnehmenden Labore erkannten mindestens neun der elf positiven Proben (81,8 Prozent) als positiv. Die Nachweisrate sank mit abnehmender MAP-Belastung der Proben ab (Tab. 1). Eindeutige methodische Gründe für unbefriedigende Ergebnisse bei der kulturellen Anzucht waren nicht erkennbar. Weder das verwendete Dekontaminationsverfahren noch die Kulturdauer wirkte sich eindeutig auf das Kulturergebnis aus (Abb. 1 a und b). Niedrige Nachweisraten scheinen überwiegend durch die praktische Durchführung der Methoden und die Erfahrung des Personals bedingt zu sein.

Anzahl Labore	Übermitteltes Ergebnis																			korrekte Befunde		
	2	3	7	13	14	19	21	22	24	15	8	1	4	11	17	23	25	12	6	8	negative Proben	positive Proben
4	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	11 / 11
4	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	10 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	10 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	kW	MAP	MAP	MAP	9 / 9	10 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kont	MAP	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	9 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	kW	MAP	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	8 / 9	9 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	8 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	aM	kont	MAP	kont	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	MAP	8 / 9	8 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	kW	MAP	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	6 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	kont	kW	MAP	MAP	kW	kW	MAP	MAP	9 / 9	5 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	kW	MAP	aM	aM	aM	MAP	aM	aM	9 / 9	4 / 11
1	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	MAP	MAP	MAP	MAP	9 / 9	3 / 11

kW - kein Wachstum; MAP - MAP nachgewiesen; aM - andere Mykobakterien nachgewiesen; kont -kontaminiert; (+)-++++ - Wachstumsintensität, aufsteigend

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse des kulturellen Nachweises von MAP in 9 negativen (Probe 2,3,7,13,14,19,21,22,24) und 11 positiven (Probe 15, 8, 1, 4, 11, 17, 23, 25, 12, 6, 8 mit aufsteigender Wachstumsintensität) Kotproben von Rindern

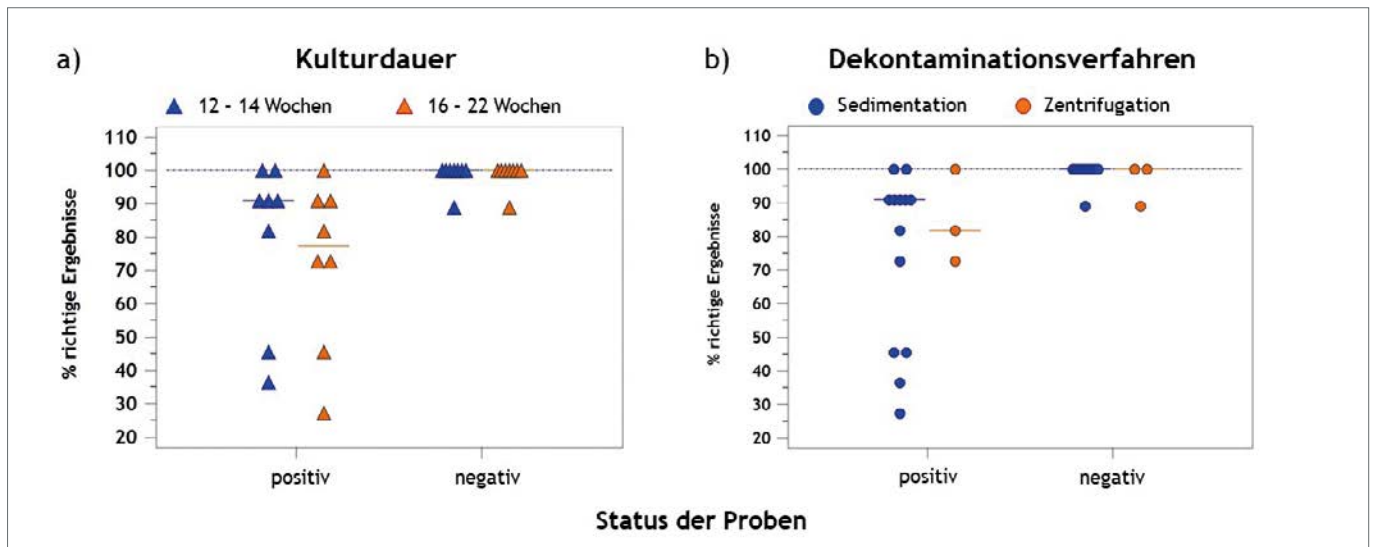


Abb. 1: Kulturelle Anzüchtung – Anteil richtiger Kulturergebnisse je Labor in Abhängigkeit von der Kulturdauer (a) und dem verwendeten Dekontaminationsverfahren (b)

Methodik des molekularbiologischen Nachweises mittels qPCR

Die Protokolle der Labore für den Direktnachweis von MAP in Kotproben waren sehr heterogen. Es kamen 15 verschiedene DNA-Extraktionsmethoden (Tab. 2) sowie fünf der sechs derzeit zugelassenen qPCR-Kits (Tab. 3) zum Einsatz. Rund

zwei Drittel der Labore setzten Magnetseparationsverfahren für die DNA-Extraktion ein und etwa zweidrittel verwendeten für die Extraktion Kits, die von den Herstellern empfohlen wurden. Nur rund 30 Prozent der Labore beurteilten die Testergebnisse anhand der in den Gebrauchsinformationen vorgegebenen Cut-off-Werte.

Anzahl Labore	Übermittelte Ergebnisse																		korrekte Befunde				
	2	3	7	13	14	19	21	22	24	15	8	1	4	11	17	23	25	12	6	18	negativ	positiv	
	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	kW	0-+	(+)	(+)-+	+	+	+	+	+	++	++++	++++			
13																					9 / 9	11 / 11	
3																						9 / 9	10 / 11
1																						9 / 9	10 / 11
1																						9 / 9	10 / 11
1																						9 / 9	9 / 11
1																						8 / 9	10 / 11
1																						7 / 9	11 / 11
1																						8 / 9	9 / 11
1																						8 / 9	9 / 11
1																						9 / 9	7 / 11
1																						9 / 9	7 / 11
2																						9 / 9	2 / 11

kW - kein Wachstum; (+)-++++ - Wachstumsintensität, aufsteigend  
 □ negativ □ positiv □ uneindeutig □ nicht auswertbar

Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse des molekularbiologischen Direktnachweises von MAP in 9 negativen und 11 positiven Kotproben von Rindern

	DNA-Extraktionsverfahren	Anzahl Labore (n)
Magnetseparation	ADIAMAG/Adiapure	1
	ADIAMAG ohne Filter	1
	EZ PREP + ID Gene Mag Paratuberculosis Extraction Kit	2
	ID Gene™ Mag Paratuberculosis Extraction Kit	1
	IndiMag Pathogen Kit	3
	innuPrep AniPath DNA/RNA Kit	2
	Kylt RNA/DNA Purification HTP	1
	MagMAX Core Nucleic Acid Purification Kit	2
	MM Core & Mech Lyss Module + Nucleic Acid Purification Kit	1
	NukEx Mag RNA/DNA Extreme SC Kit	3
	RSC Blood Kit	1
Säulenbasiert	MN NucleoSpin Soil	2
	EZ PREP + ID Gene Spin Universal Extraction Kit	1
	Indispin Pathogen Kit	3
	IndiSpin QIAcube HT Pathogen Kit	1

Tab. 3: Methodik des molekularbiologischen MAP-Nachweises: Prinzip des DNA-Extraktionsverfahrens, verwendete Kits und Anzahl der Labore, die die jeweiligen Kits verwenden

### Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises mittels qPCR

86 Prozent der teilnehmenden Labore erkannten mindestens neun der elf positiven Proben (81,8 Prozent) als positiv. Die Nachweisrate war bei den schwach mit MAP belasteten Proben am geringsten (Tab. 4). Auch beim Direktnachweis mittels PCR konnten keine eindeutigen methodischen Ursachen für unbefriedigende Ergebnisse identifiziert

werden. Unabhängig vom verwendeten qPCR-Kit war eine relativ große Variabilität der CT-Werte bei den einzelnen Proben festzustellen (Abb. 2 a). Das Prinzip des verwendeten DNA-Extraktionsverfahrens (Magnetseparation vs. säulenbasiertes Verfahren) hatte keinen entscheidenden Einfluss auf das qPCR-Ergebnis (Abb. 2 b). Bei einem Teilnehmer könnte die Verwendung eines für Kotproben ungeeigneten DNA-Extraktionskits für die niedrige Nachweisrate verantwortlich sein.

qPCR-Kit	Anzahl Labore (n)
bactotype MAP PCR Kit	9
ADIAVET PARATB REAL TIME	7
ID Gene Paratuberculosis Duplex	4
diarellaMAP vet real time PCR Kit	3
VetMAX MAP Real-Time PCR Screening Kit	2

Tab. 4: Übersicht über die qPCR-Kits, die für den molekularbiologischen Nachweis von MAP in Kotproben verwendet werden und Anzahl der Labore, die das jeweilige Kit einsetzen



## Fazit

Der molekularbiologische Nachweis von MAP in Kotproben mittels qPCR wird inzwischen in einer größeren Anzahl an Laboren durchgeführt als der kulturelle Nachweis. Während sich die Vorgehensweise der Labore beim kulturellen Nachweis im Vergleich zu vorangegangenen Laborvergleichsuntersuchungen immer mehr angeglichen hat, ist eine große methodische Heterogenität beim molekularbiologischen Nachweis zu verzeichnen. Bei beiden Verfahren waren die Nachweisraten bei schwach mit MAP

belasteten Proben am geringsten. Eindeutige methodische Ursachen für unbefriedigende Nachweisraten konnten jedoch nicht identifiziert werden. Deshalb lässt sich schlussfolgern, dass einer sorgfältigen praktischen Durchführung der Verfahren durch gut eingearbeitetes Personal eine besondere Bedeutung zukommt.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der teilnehmenden Labore für die gute Zusammenarbeit und Sandy Werner für die exzellente technische Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der LVU.

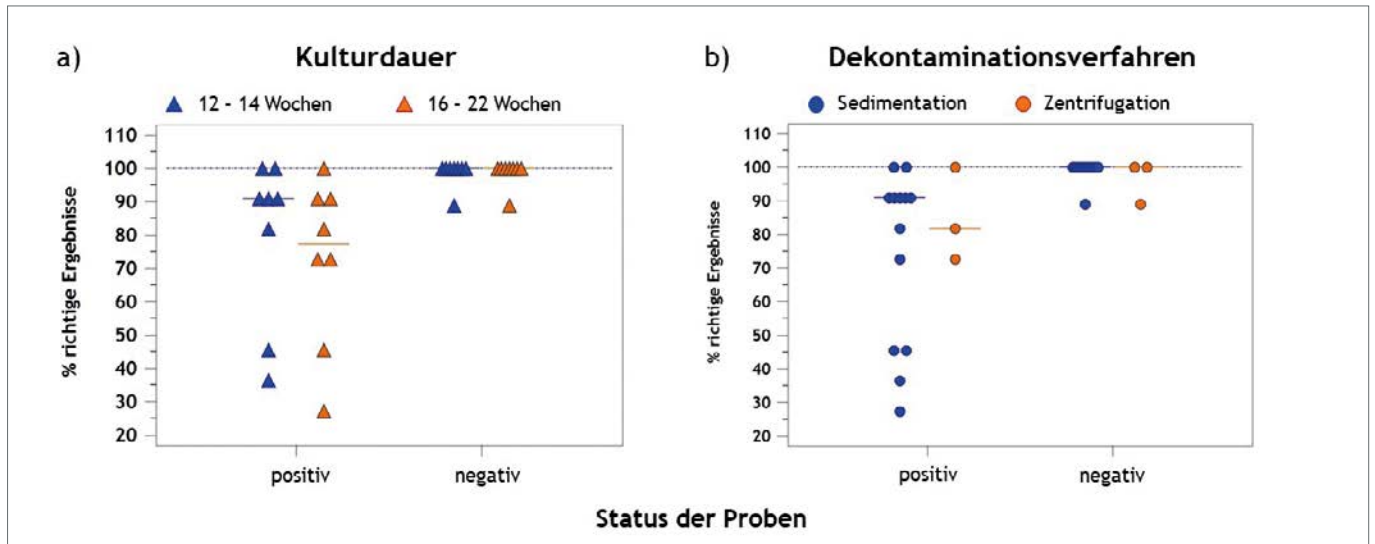


Abb. 2: Molekularbiologischer Nachweis mittels qPCR – Verteilung der CT-Werte, die die Labore bei den einzelnen Proben erreichten in Abhängigkeit vom Prinzip der DNA-Extraktion (a) und dem verwendeten qPCR-Kit (b)

## KURZNACHRICHTEN

### Studie zum Übergang von Influenzaviren zwischen Menschen und Hausschweinen

Das FLI führt seit einem Jahr eine Studie zum Übergang von Influenzaviren zwischen Menschen und Hausschweinen durch. Hierfür werden nach wie vor Teilnehmerinnen und Teilnehmer gesucht.

#### Wer kann teilnehmen?

- Jede Person mit regelmäßigem Kontakt zu Hausschweinen, d.h. Tierärztinnen und Tierärzte, Mitarbeitende auf landwirtschaftlichen Betrieben.
- Schweinebetriebe können gleichzeitig kostenfrei Ihre Schweine auf Influenzaviren untersuchen lassen – das Beprobungsmaterial wird gestellt, die Versandkosten übernommen.

#### Wie läuft die Teilnahme?

- Die Teilnehmerinnen und Teilnehmer werden gebeten über einen Zeitraum von mehreren Monaten (möglichst über ein Jahr) sich selbst Tupferproben aus der Nase zu entnehmen und zur Untersuchung auf Influenzaviren zur Verfügung zu stellen. Die Entnahme kann wahlweise monatlich oder quartalsweise erfolgen. Eine regelmäßige Probennahme wird mit einer Aufwandsentschädigung von 20€ anerkannt.

Bei Interesse oder weiteren Fragen kontaktieren Sie bitte diese Adresse: [flu-selbsttest@fli.de](mailto:flu-selbsttest@fli.de)

### „Silberner“ LabLoeffler

Mit Nr. 25 feiert der LabLoeffler im November 2022 silbernes Jubiläum. Unsere „News für das Labor“ entwickeln sich seit der ersten Ausgabe von Juni 2008 stetig fort, insbesondere das äußere Erscheinungsbild änderte sich im Laufe der Jahre stark. Vorläufer des LabLoefflers waren die IVD- und FLI-Nachrichten, an die sich vielleicht noch einige (dunkel) erinnern können. Geblieben sind die Themenschwerpunkte Referenzlaborarbeit und Diagnostik, mit denen wir insbesondere die in der Veterinärmedizin der Bundesländer tätigen Kolleginnen auf dem Laufenden halten wollen. Der enge Kontakt zu diesen ist für unsere Referenzlabore

essentiell. Interessierte Leserschaft findet der LabLoeffler darüber hinaus in Forschungseinrichtungen, an Universitäten und in Unternehmen aus dem Bereich Veterinärmedizin und -medizin.

Besondere Starthilfe für den LabLoeffler gab der FLI-Standort Jena mit Dr. habil. Christine Klaus bei der Zusammenstellung der Themen und Akquise der Beiträge sowie Wolfram Maginot, der in den ersten Jahren das Layout des LabLoefflers übernahm. An dieser Stelle ein herzliches Dankeschön des aktuellen Redaktions- und Layout-Teams dafür!



Seit der ersten Ausgabe entwickelt sich das Erscheinungsbild des LabLoeffler stetig weiter. (© J. King, FLI)

## KURZNACHRICHTEN

### Für 2023 geplante Laborvergleichsuntersuchungen des Friedrich-Loeffler-Instituts

NRL	Methode	Prüfgegenstand	2023		2023		Ansprechpartner Name
			Q1	Q2	Q3	Q4	
IHN, VHS, KHV, ISA	(RT)-(q)PCR, Zellkultur, Sequenzierung	erregerhaltiges Probenmaterial	x				PD Dr. U. Fischer, Dr. H. Schütze
WNV	Molekularbiologie: PCR	RNA-Proben	x				Dr. Ute Ziegler
Tollwut	PCR, FAT	RNA-Proben		x			Dr. Thomas Müller
Rauschbrand	Mikrobiologie: Kultur, Speziesidentifikation	Bakterienisolate		x			Dr. Christian Seyboldt
TSE	ELISA	Gehirn (Rind, Schaf, Zervide)		x			Dr. Christine Fast
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
Toxoplasmose	Molekularbiologie: PCR	DNA-Nachweis				x	Dr. Gereon Schares
Rotz, Brucellose, Milzbrand	PCR	DNA-Nachweis				x	Dr. Mandy Elschner, Dr. Falk Melzer
Lungenseuche der Rinder (AG Chlamydien und Mykoplasmen)	PCR	Milch				x	Dr. Martin Heller

### Aus der Zulassungsstelle



Alle Informationen der Zulassungsstelle finden Sie auch auf der FLI-Homepage unter [www.fli.de](http://www.fli.de) in der Rubrik „Service > Zulassungsstelle“.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Dr. Jana Heidrich.  
E-Mail: [jana.heidrich@fli.de](mailto:jana.heidrich@fli.de)

Jana Heidrich  
(© W. Maginot, FLI)

Erteilung einer Zulassung gemäß § 11 Abs. 2 des Tiergesundheitsgesetzes (05.2022 bis 10.2022)				
Bezeichnung des Mittels	Art der Anwendung	Zul.-Nr.	Datum der Zulassung	Pharmazeutischer Unternehmer
virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit Kurzform: virotype BVDV 2.0	real time RT-PCR	FLI-C 112	29.08.2022	INDICAL BIOSCIENCE GmbH D-04103 Leipzig
virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit Kurzform: virotype BTV pan/8 2.0	real time RT-PCR	FLI-C 114	21.10.2022	INDICAL BIOSCIENCE GmbH D-04103 Leipzig
virotype SBV 2.0 RT-PCR Kit Kurzform: virotype SBV 2.0	real time RT-PCR	FLI-C 115	25.10.2022	INDICAL BIOSCIENCE GmbH D-04103 Leipzig



## Nationale Referenzlaboratorien (NRLs) am FLI

Für die aufgeführten anzeigepflichtigen Tierseuchen wurden folgende Nationale Referenzlaboratorien benannt:

Tierseuche	Leiter/Leiterin	Fachinstitut	Telefon	E-mail
Affenpocken	PD Dr. D. Hoffmann	IVD, Insel Riems	038351 7-1628	donata.hoffmann@fli.de
Afrikanische Pferdepest	Dr. B. Hoffmann	IVD, Insel Riems	038351 7-1201	bernd.hoffmann@fli.de
Afrikanische Schweinepest	PD Dr. S. Blome	IVD, Insel Riems	038351 7-1144	sandra.blome@fli.de
Amerikanische Faulbrut	Dr. M. Schäfer	IMED, Insel Riems	038351 7-1246	marc.schaefer@fli.de
Ansteckende Blutarmut der Einhufer (Infektiöse Anämie der Einhufer)	Dr. P. König	IVD, Insel Riems	038351 7-1141	patricia.koenig@fli.de
Ansteckende Blutarmut der Lachse (Infektiöse Anämie der Lachse)	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de
Aujeszkysche Krankheit	Dr. T. Müller	IMVZ, Insel Riems	038351 7-1659	thomas.mueller@fli.de
Befall mit dem Kleinen Bienenbeutenkäfer ( <i>Aethina tumida</i> )	Dr. M. Schäfer	IMED, Insel Riems	038351 7-1246	marc.schaefer@fli.de
Befall mit Tropilaelaps-Milbe	Dr. M. Schäfer	IMED, Insel Riems	038351 7-1246	marc.schaefer@fli.de
Beschläuseuche der Pferde	Dr. G. Schares	IfE, Insel Riems	038351 7-1544	gereon.schaes@fli.de
Blauzungenkrankheit	Dr. B. Hoffmann	IVD, Insel Riems	038351 7-1201	bernd.hoffmann@fli.de
Bovine Herpes Virus Typ 1-Infektion (alle Formen)	Prof. Dr. M. Beer	IVD, Insel Riems	038351 7-1200	martin.beer@fli.de
Bovine Virus Diarrhoe	PD Dr. K. Wernike	IVD, Insel Riems	038351 7-1509	kerstin.wernike@fli.de
Brucellose der Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen	Dr. F. Melzer	IBIZ, Jena	03641 804-2466	falk.melzer@fli.de
Ebola Virus Infektionen	Dr. S. Diederich	INNT, Insel Riems	038351 7-1516	sandra.diederich@fli.de
Enzootische Leukose der Rinder	Dr. P. König	IVD, Insel Riems	038351 7-1141	patricia.koenig@fli.de
Epizootische Hämato-poetische Nekrose	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de
Epizootische Hämorrhagie der Hirsche	Dr. B. Hoffmann	IVD, Insel Riems	038351 7-1201	bernd.hoffmann@fli.de
Geflügelpest (Aviäre Influenza)	Prof. Dr. T. Harder	IVD, Insel Riems	038351 7-1152	timm.harder@fli.de
Infektiöse Epididymitis bei Schafen & Ziegen	Dr. F. Melzer	IBIZ, Jena	03641 804-2466	falk.melzer@fli.de
Infektiöse Hämato-poetische Nekrose der Salmoniden	Dr. H. Schütze	IMED, Insel Riems	038351 7-1254	heike.schuetze@fli.de
Infektion mit West-Nile-Virus bei einem Vogel oder Pferd	Dr. U. Ziegler	INNT, Insel Riems	038351 7-1287	ute.ziegler@fli.de
Koi Herpesvirus-Infektion der Karpfen	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de

Lumpy-skin-Krankheit ( <i>Dermatitis nodularis</i> )	Dr. B. Hoffmann	IVD, Insel Riems	038351 7-1201	bernd.hoffmann@fli.de
Lungenseuche der Rinder	Dr. M. Heller	IMP, Jena	03641 804-2425	martin.heller@fli.de
Maul- und Klauenseuche	Dr. M. Eschbaumer	IVD, Insel Riems	038351 7-1211	michael.eschbaumer@fli.de
Milzbrand	Dr. M. Elschner	IBIZ, Jena	03641 804-2428	mandy.elschner@fli.de
Muschelkrankheiten	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de
Infektion mit <i>Bonamia extiosa</i> , <i>Bonamia ostreae</i> , <i>Marteilia refringens</i> , <i>Microcytos mackini</i> , <i>Perkinsus marinus</i>				
Newcastle-Krankheit	PD Dr. C. Grund	IVD, Insel Riems	038351 7-1545	christian.grund@fli.de
Niedrigpathogene aviäre Influenza bei einem gehaltenen Vogel	Prof. Dr. T. Harder	IVD, Insel Riems	038351 7-1152	timm.harder@fli.de
Pest der kleinen Wiederkäuer	Dr. B. Hoffmann	IVD, Insel Riems	038351 7-1201	bernd.hoffmann@fli.de
Pferdeenzephalomyelitis (alle Formen)	Dr. M. Keller	INNT, Insel Riems	038351 7-1517	markus.keller@fli.de
Pockenseuche der Schafe und Ziegen	Dr. B. Hoffmann	IVD, Insel Riems	038351 7-1201	bernd.hoffmann@fli.de
Rauschbrand	Dr. C. Seyboldt	IBIZ, Jena	03641 804-2295	christian.seyboldt@fli.de
Rifttal-Fieber	Dr. M. Eiden	INNT, Insel Riems	038351 7-1189	martin.eiden@fli.de
Rinderpest	Dr. B. Hoffmann	IVD, Insel Riems	038351 7-1201	bernd.hoffmann@fli.de
Rotz	Dr. M. Elschner	IBIZ, Jena	03641 804-2428	mandy.elschner@fli.de
Salmonellose der Rinder	PD Dr. U. Methner	IBIZ, Jena	03641 804-2267	ulrich.methner@fli.de
Schweinepest (klassische Schweinepest)	PD Dr. S. Blome	IVD, Insel Riems	038351 7-1144	sandra.blome@fli.de
<i>Stomatitis vesicularis</i>	Dr. M. Eschbaumer	IVD, Insel Riems	038351 7-1211	michael.eschbaumer@fli.de
Taura-Syndrom	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de
Tollwut	Dr. T. Müller	IMVZ, Insel Riems	038351 7-1659	thomas.mueller@fli.de
Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (alle Formen)	Dr. C. Fast	INNT, Insel Riems	038351 7-1274	christine.fast@fli.de
Trichomonadenseuche der Rinder	Dr. L. Sprague	IBIZ, Jena	03641 804-2462	lisa.sprague@fli.de
Tuberkulose der Rinder ( <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i> )	Dr. S. Barth	IMP, Jena	03641 804-2270	stefanie.barth@fli.de
Vesikuläre Schweinekrankheit	Dr. M. Eschbaumer	IVD, Insel Riems	038351 7-1211	michael.eschbaumer@fli.de
Vibriose der Rinder (bovine genitale Campylobacteriose)	Dr. H. H. El-Adawy	IBIZ, Jena	03641 804-2249	hosny.ElAdawy@fli.de
Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden	Dr. H. Schütze	IMED, Insel Riems	038351 7-1254	heike.schuetze@fli.de
Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de
Yellowhead Disease	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de

## NRLs für meldepflichtigen Tierkrankheiten

Tierkrankheiten	Leiter/Leiterin	Fachinstitut	Telefon	E-mail
Ansteckende Equine Metritis (CEM) (Contagiöse Equine Metritis)	Dr. F. Melzer	IBIZ, Jena	03641 804-2466	falk.melzer@fli.de
Bornavirus-Infektionen der Säugetiere	PD. Dr. D. Rubbenstroth	IVD, Insel Riems	038351 7-1521	dennis.rubbenstroth@fli.de
Campylobacteriose (thermophile Campylobacter)	Dr. H. H. El-Adawy	IBIZ, Jena	03641 804-2249	hosny.ElAdawy@fli.de
Chlamydiose	Dr. C. Schnee	IMP, Jena	03641 804-2435	christiane.schnee@fli.de
Echinokokkose	Dr. Pavlo Maksimov	IfE, Insel Riems	038351 7-1892	Pavlo.Maksimov@fli.de
Equine Virus-Arteritis-Infektion	Dr. P. König	IVD, Insel Riems	038351 7-1141	patricia.koenig@fli.de
Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT)	Dr. W. Fuchs	IMVZ, Insel Riems	038351 7-1258	walter.fuchs@fli.de
Maedi / Visna	Dr. P. König	IVD, Insel Riems	038351 7-1141	patricia.koenig@fli.de
Niedrigpathogene aviäre Influenza der Wildvögel	Prof. Dr. T. Harder	IVD, Insel Riems	038351 7-1152	timm.harder@fli.de
Paratuberkulose	Dr. H. Köhler	IMP, Jena	03641 804-2240	heike.koehler@fli.de
Q-Fieber	Dr. K. Mertens-Scholz	IBIZ, Jena	03641 804-2499	katja.mertens-scholz@fli.de
SARS-CoV-2-Infektion bei Haustieren	Dr. M. Keller	INNT, Insel Riems	038351 7-1517	markus.keller@fli.de
Schmallenberg-Virus-Infektionen	PD Dr. K. Wernike	IVD, Insel Riems	038351 7-1509	kerstin.wernike@fli.de
Toxoplasmose	Dr. G. Schares	IfE, Insel Riems	038351 7-1544	geroon.schaes@fli.de
Tularämie	PD Dr. H. Tomaso	IBIZ, Jena	03641 804-2243	herbert.tomaso@fli.de
Verotoxin bildende <i>Escherichia coli</i>	Prof. Dr. C. Menge	IMP, Jena	03641 804-2430	christian.menge@fli.de

## Weitere NRLs und Konsiliarlabore am FLI

Tierkrankheit	Leiter/Leiterin	Fachinstitut	Telefon	E-mail
Bunyvirale Erkrankungen (Hanta-Virus)	PD Dr. R. Ulrich	INNT, Insel Riems	038351 7-1159	rainer.ulrich@fli.de
Caprine Arthritis und Enzephalitis	Dr. P. König	IVD, Insel Riems	038351 7-1141	patricia.koenig@fli.de
Japanische Enzephalitis	Prof. Dr. M. Groschup	INNT, Insel Riems	038351 7-1163	martin.groschup@fli.de
Krebstierkrankheiten (Krustazeen) <sup>1</sup>	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de
Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber	Prof. Dr. M. Groschup	INNT, Insel Riems	038351 7-1163	martin.groschup@fli.de
Muskelkrankheiten (Bivalvia) <sup>1</sup>	PD Dr. U. Fischer	IMED, Insel Riems	038351 7-1105	uwe.fischer@fli.de
NIPAH/Hendra Virusinfektion	PD Dr. A. Balkema-Buschmann	INNT, Insel Riems	038351 7-1161	anne.buschmann@fli.de
Konsiliarlabor für Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD)-Virus	Dr. P. König	IVD, Insel Riems	038351 7-1141	patricia.koenig@fli.de

<sup>1</sup> Neben den anzeigenpflichtigen Tierseuchen der Krebstiere und Muschelkrankheiten sind international bei der OIE weitere Krankheiten gelistet



## Impressum

Herausgeber: Friedrich-Loeffler-Institut,  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Redaktion: Prof. Dr. Martin Beer, Elke Reinking

Anschrift der Redaktion:  
Friedrich-Loeffler-Institut,  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,  
Südufer 10, 17493 Greifswald – Insel Riems,  
E-Mail: [elke.reinking@fli.de](mailto:elke.reinking@fli.de)

Fotos:  
Deckblatt und Rückseite: Jaqueline King, FLI  
Vorwort: Wolfram Maginot, Jaqueline King, FLI

Layout und Satz: Katja von Einsiedel

Druck: [wicher.print.medien.service](http://wicher.print.medien.service). UG  
(haftungsbeschränkt)

LabLoeffler Nr. 25, Ausgabe 2/2022  
ISSN 2190-7153

November 2022

## Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Institut für Epidemiologie  
Institut für Immunologie  
Institut für Infektionsmedizin  
Institut für Internationale Tiergesundheit/One Health  
Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie  
Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger  
Institut für Virusdiagnostik

Südufer 10  
17493 Greifswald – Insel Riems  
Tel.: +49 38351 7-0

[www.fli.de](http://www.fli.de)  
E-Mail: [internetredaktion@fli.de](mailto:internetredaktion@fli.de)

Institut für molekulare Pathogenese  
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen  
Naumburger Straße 96 a  
07743 Jena  
Tel.: +49 3641 804-0

Institut für Tierernährung  
Bundesallee 37  
38116 Braunschweig  
Tel.: +49 531 58044-102

Institut für Nutztiergenetik  
Höltysstraße 10  
31535 Neustadt  
Tel.: +49 5034 871-5136

Institut für Tierschutz und Tierhaltung  
Dörnbergstraße 25/27  
29223 Celle  
Tel.: +49 5141 3846-102

