

Amtliche Methode und Falldefinition

Milzbrand

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differenzialdiagnostik	4
1.4 Diagnostische Indikation	4
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils gültigen Fassung)	4
2. Untersuchungsmaterial	5
2.1 Gewinnung	5
2.2 Transport und Lagerung	5
3. Untersuchungsgang	5
3.1 Erregernachweis	6
3.2 Genotypisierung, Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik	9
3.3 Antibiotikaresistenz-Testung	9
Falldefinition - Milzbrand; <i>Bacillus anthracis</i>	22

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Bacillus (B.) anthracis ist der Erreger des Milzbrandes, einer meist akuten und oft tödlich verlaufenden Infektionskrankheit mit septikämischem Charakter. Haus- und Wildwiederkäuer sind hochempfindlich für Milzbrand. Schweine, Fleischfresser und auch Menschen (eher mäßig) sowie Vögel (Ausnahme Strauß) gelten als fast resistent. Die Krankheit ist weltweit verbreitet und kommt am häufigsten in Asien (Naher und Ferner Osten, Indien), Afrika und Südamerika vor; in Europa sind der mediterrane Raum und Osteuropa am stärksten betroffen.

Der Milzbranderreger bildet Sporen als Dauerformen, die sich über Jahrzehnte im Erdboden als ansteckungsfähig erhalten können. Milzbrandsporen werden weder durch Fäulnis noch durch Eintrocknen oder beim Gerben der Häute vernichtet.

1.2 Klinische Symptomatik

Die Ansteckung erfolgt gewöhnlich durch die Aufnahme von Milzbrandsporen mit dem Futter oder Trinkwasser. Nur in Ausnahmefällen wird die Krankheit von Tier zu Tier übertragen. Auch eine Ansteckung über Milzbrandsporen enthaltende Stäube und Aerosole ist möglich. Die Inkubationszeit bei natürlich infizierten empfänglichen Tieren wird angegeben mit 1-14 Tage oder mehr.

Milzbrand ist am lebenden Tier selten mit Sicherheit festzustellen.

Beim Rind und Schaf treten meist plötzliche Todesfälle auf. Aus den Körperöffnungen (Anus, Vulva, Mund, Nase) tritt dunkles, schlecht gerinnendes Blut. Erst bei der Zerlegung ist ein Verdacht auf Milzbrand festzustellen. Wenn weitere Tiere mit hohem Fieber, unregelmäßigem Puls, beschleunigter Atmung und evtl. Kolikerscheinungen erkranken, liegt der Verdacht auf Milzbrand nahe. Tierärztliche Behandlung ist nur dann Erfolg versprechend, wenn sie frühzeitig einsetzen kann.

Beim Pferd: plötzlich hochfieberhafte Erkrankung mit Kolik, Schling- und Atembeschwerden, Atemnot wegen Schwellung im Kehlgangsbereich, auch scheinbare Besserung und Tod nach mehreren Tagen.

Beim Schwein können Krankheitserscheinungen am lebenden Tier fehlen, in vereinzelten Fällen sind Atembeschwerden infolge Rachenentzündung sowie Verfärbung und Schwellung im Bereich des Kehlkopfes (Milzbrandbräune) zu beobachten. Die größte Zahl der Milzbrandfälle wird erst bei der Fleischbeschau oder in der Tierkörperbeseitigungsanstalt festgestellt.

1.3 Differenzialdiagnostik

Pasteurellose, Rauschbrand, Pararauschbrand, Vergiftungen

1.4 Diagnostische Indikation

klinische Symptome sowie epidemiologisch begründeter Verdacht

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Zuständige Landesuntersuchungsämter
- Nationales Referenzlabor am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Bakterielle Infektionen und Zoonosen, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils gültigen Fassung)

Deutsches Recht

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) vom 22. Mai 2013
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 23. Mai 1991
- Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand vom 23. Mai 1991

EU-Recht

- Verordnung (EU) 2016/429 vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“), Anhang II „Liste der Seuchen“ (geändert durch Verordnung (EU) 2018/1629 vom 25. Juli 2018): zur Infektion mit *Burkholderia mallei* (Rotz)
- Verordnung (EU) 2017/625 vom 15. März 2017 zu amtlichen Kontrollen und anderen amtlichen Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 vom 3. Dezember 2018 „Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/687 vom 17. Dezember 2019 „Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 vom 17. Dezember 2019 „Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 vom 17. Dezember 2019 „Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen“

- Delegierte Verordnung (EU) 2020/692 vom 30. Januar 2020 „Vorschriften für den Eingang von Sendungen von bestimmten Tieren, bestimmtem Zuchtmaterial und bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs in die Union und für deren anschließende Verbringung und Handhabung“
- Delegierte Verordnung (EU) 2023/361 vom 28. November 2022 „Vorschriften für die Verwendung bestimmter Tierarzneimittel zur Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen“

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Gewinnung

Zur Untersuchung sollte nur frisch entnommenes Material verwendet werden.

Vom lebenden Tier: Blut aus der Ohrvene (*B. anthracis* ist nur 16 bis 18 h vor dem Tod im Blut nachweisbar)

Vom toten Tier: Ganze Kadaver, Sektionsmaterial, aber auch Blutausstriche und tierische Produkte wie Häute, Haare, Wolle, Tierkörpermehle

2.2 Transport und Lagerung

Während des Transportes und evtl. notwendig werdender kurzzeitiger Lagerung ist das Material kühl bei $+7\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ aufzubewahren.

Untersuchungsmaterial vorschriftsmäßig gemäß der entsprechenden Gefahrgutverordnung Straße (ADR) und Eisenbahn (RID), Luftverkehr (IATA-DGR), DIN EN 829 in der jeweils geltenden Fassung, in dicht schließenden Behältnissen verpackt, gekennzeichnet, zusammen mit Vorbericht und Untersuchungsantrag nach vorheriger telefonischer Absprache schicken.

Wegen möglicher Gefährdungen während des Transportes sollte Milzbrand-verdächtigtes Untersuchungsgut durch Kurier übermittelt werden.

Die Proben sind mit dem entsprechende Einsendebogen an das FLI zu senden. Dieser kann unter folgendem Link heruntergeladen werden: <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-bakterielle-infektionen-und-zoonosen-ibiz/referenzlabore/nrl-fuer-milzbrand/>

3. Untersuchungsgang

Vorsichtsmaßnahmen

Der Umgang mit potentiell *B. anthracis*-haltigem Material und Kulturen ist genehmigungspflichtig und darf nur in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 vorgenommen werden und die entsprechenden Maßnahmen für biologische Sicherheit sind zu beachten.

3.1 Erregernachweis

Der Nachweis von *B. anthracis* sollte durch eine Kombination von mikroskopischen, kulturellen und molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt werden.

3.1.1 Kulturelle Untersuchung

Die kulturelle Anzucht gilt als sehr sichere Nachweismethode. Als Ausgangsmaterial werden o. g. Materialien empfohlen. (Rezepturen s. Anhang)

Anreicherung

Eine Anreicherung ist üblich besonders bei der Untersuchung von Futtermitteln, die Tierkörpermehle enthalten, aber auch bei Häuten, Haaren, Wolle, Oberflächentupfern und komplexen Proben. Beimpfung einer Nährbouillon, die mindestens 18 h bei 37 °C aerob bebrütet wird. Kontaminiertes Material sollte mit einer selektiven Anreicherungsbouillon für *B. anthracis*/*B. cereus*-Sporen angereichert werden.

Schon nach 6 h Schütteln bei 37 °C wird die exponentielle Wachstumsphase erreicht und man kann auf Selektivnährmedien (s. u.) überimpfen. Zur Sicherheit sollte die angesetzte Bouillonkultur bis 18 h bei 37 °C weiter bebrütet und danach auf Selektivnährmedien ausgestrichen werden.

Wird das Untersuchungsmaterial zur Ausschaltung der vegetativen Kontaminanten für 20 min bei 65 °C erhitzt, kann die angegebene Anreicherungsbouillon für *B. anthracis*/*B. cereus* auch ohne Hemmstoffe verwendet werden. Dadurch verkürzt sich die Anreicherungszeit auf 4 h Schütteln bei 37 °C (Reissbrodt et al., 2004).

Bei Untersuchung von frischem Kadavermaterial entfällt die Erhitzung vor der Anreicherung.

Direktkultur

Diese erfolgt auf festen Nährmedien wie Blutagar oder den unten angeführten Selektivnährmedien. Hierbei sind stets mehrere Platten zu verwenden. Die Beimpfung erfolgt direkt oder nach Vorbehandlung und/oder Anreicherung (s. o.). Die Platten werden mindestens 18 h bei 37 °C aerob bebrütet.

Infolge morphologischer Ähnlichkeiten kommt der Abgrenzung zwischen *B. anthracis* und seinen taxonomisch nächsten Verwandten *B. cereus*, *B. thuringiensis* und *B. mycoides* (*B. cereus*-Gruppe) besondere praktische Bedeutung zu.

Weiterhin sind differentialdiagnostisch einige Antibiotika bildende Arten von Interesse, wie z. B. *B. polymyxa* (Polymyxin B), *B. brevis* (Tyrothricin), *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* (Bacitracin).

Auch *B. megaterium* (Erdbazillus) kann im Rahmen der Differentialdiagnostik eine Rolle spielen.

Nach 18- bis 24-stündiger Bebrütung sind Kolonien von *B. anthracis* mittelgroß bis groß (etwa 0,5 cm), mattglänzend oder trocken, flach, nicht pigmentiert, mit flockig-spiraliger Oberfläche und von butterartiger Konsistenz, „Eischneeffekt“, auf Blutagar ohne Hämolyse.

Selektive Nährmedien

TMSP-Agar

Auf diesem semiselektiven Nährboden finden *Bacillus* spp. eine gute Nährstoffbasis, um schnell zu charakteristischen großen Kolonien auszuwachsen. Das Wachstum von *B. subtilis* und *B. megaterium* ist vollständig gehemmt. Das Wachstum von Staphylokokken, von Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* und Enterokokken ist entweder ebenso vollständig gehemmt oder stark reduziert. Der Zusatz von Schafblut unterstützt das Wachstum, gleichzeitig ist das Auftreten einer starken Hämolyse um die Kolonien der anderen *Bacillus* spp. - wie *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. licheniformis* - ein hervorragendes Differenzierungsmerkmal zu *B. anthracis*. *B. anthracis*-Stämme wachsen als weiße, große Kolonien (2 bis 6 mm im Durchmesser) mit charakteristischer stumpfer Oberfläche ohne Hämolyse (Tab. 2).

Chromogener *B. cereus*-Ident-Selektivagar

Zur weiteren Differenzierung der *Bacillus* spp. kann ein kommerzieller *B. cereus* Agar mit Supplement (z. B. Thermo Scientific™ Brilliance™ *Bacillus-Cereus*-Agarbasis (CM1036B) Artikelnummer 10528623; Thermo Scientific™ Brilliance™ *Bacillus Cereus*, Selektiv-Ergänzungstoff Artikelnummer 13265409) entsprechend Herstellerangaben empfohlen genutzt werden. Dieser Agar kann zur Abgrenzung von *B. cereus*-group hilfreich sein. *B. cereus*-group Spezies enthalten Phosphatidylinositol - phospholipase. Damit sind sie in der Lage das chromogene Substrat X-myoinositol-1-phosphat zu spalten. Sie wachsen als türkise Kolonien. Eine grampositive oder gramnegative Begleitflora wird dabei weitgehend oder vollständig gehemmt.

Phagentest

Der Phagentest wird unter Anwendung des für *B. anthracis* spezifischen Gamma-Phagen durchgeführt. Als Ausgangskultur kann einerseits eine 3- bis 4-stündige Nährbouillonkultur oder eine leicht trübe Suspension des verdächtigen Koloniematerials in steriler physiologischer Kochsalzlösung oder auch mit dem resuspendierten Koloniematerial direkt verwendet werden. Stets sollte als Positivkontrolle ein gut charakterisierter Milzbrandstamm und als Negativkontrolle ein *B. cereus*-Stamm bei gleicher Präparationstechnik in die Untersuchung einbezogen werden.

Durchführung:

Auf Blutagar wird auf der Rückseite der Petrischale mit Schablone eine kreisrunde Fläche (Ø 2 cm) markiert. Auf dieser Fläche wird das Probenmaterial verteilt. Den Inhalt einer Öse mit Phagensuspension (Titer mindestens 10⁸) exzentrisch auf diesen Bereich auslaufen lassen, (Flüssigkulturen müssen vorher erst eintrocknen). Im günstigen Falle erkennt man schon nach 4 bis 6 Stunden ein zartes Wachstum und das typische Phagenloch, wenn es sich um *B. anthracis* handelt.

Der Ansatz wird bei 37 °C bebrütet und frühestens nach 5 Stunden und optimal nach 24 Stunden abgelesen.

Beweglichkeitstest

Die Prüfung der Beweglichkeit des Bakteriums erfolgt auf halbfestem Agar. Tetrazoliumsalze sind farblos, werden aber bei Bakteriumwachstum in die Zellen aufgenommen und zu einem roten Farbstoff (Formazan) reduziert. Die Beweglichkeit kann damit durch „Ausschwärmen“ der Bakterien auf dem Nährmedium sichtbar gemacht werden.

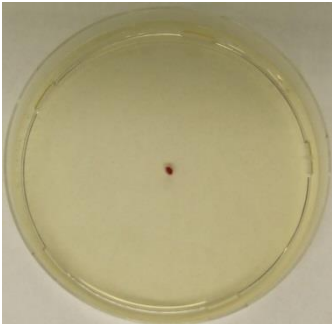

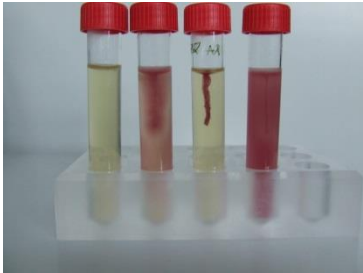
Milzbrand

Durchführung:

Koloniematerial (nur wenig!) wird nur mit der Pipettenspitze angetippt und in die Mitte eines halbfesten TTC-haltigen Nähragars gedrückt.

Platte nicht umdrehen, 24 Stunden bebrüten bei 37 °C.

Auswertung:

Unbeweglich: <i>B. anthracis</i>	Beweglich: <i>B. cereus</i>	Alternativ im Röhrchen: a-unbeimpft, b,d-beweglich c-unbeweglich a b c d
		

3.1.2 Kapseldarstellung

Virulente bekapselte *B. anthracis* sind im Gewebe, Blut oder anderen Körperflüssigkeiten von frisch an Milzbrand verendeten Tieren präsent (s. Anhang). Nach Kultivierung auf künstlichen Nährmedien geht die Kapsel jedoch rasch verloren. Der Kapselnachweis in Kulturen ist nur möglich, wenn diese auf bikarbonathaltigen Nährböden unter 5- bis 7%iger CO₂-Atmosphäre (optimalerweise 12 - 20% CO₂) kultiviert wurden, kann aber auch hier teilweise nur begrenzt erfolgen. Auch eine Kultivierung in defibriniertem Pferde-, Rinder- oder Schafblut führt nicht regelmäßig zur Ausprägung einer deutlichen Kapsel. Gelingt die Kapseldarstellung jedoch, ist sie ein Hinweis auf das Vorhandensein eines virulenten *B. anthracis*, da andere *Bacillus* spp., wie z. B. *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. cereus* keine Kapsel haben.

3.1.3 Molekulare Nachweisverfahren

Für den Nachweis von *B. anthracis* in DNA-Präparationen aus Blut- oder Organmaterial bzw. aus Kulturmaterial stehen verschiedene Realtime-PCRs mit TaqMan- oder FRET-Sonden zur Verfügung. Der Nachweis der beiden Virulenzplasmide pX01 (kodierend für protektives Antigen) und pX02 (kodierend für Kapselantigen) reicht für den Nachweis eines virulenten *B. anthracis* Isolates aus.

Nicht alle beschriebenen chromosomalen Marker sind spezifisch für *B. anthracis*. Der chromosomale Marker PL3 (Prophage LambdaBa03) wurde als besonders spezifischer Marker identifiziert. (Agren *et al.*, 2013; s. Anhang).

3.2 Genotypisierung, Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik

Zu den Standard-Genotypisierungsmethoden für *B. anthracis* gehören die kanonische Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (canSNP) und Multilocus-Analyse mit variabler Anzahl tandem repeats (VNTRs) Analyse (MLVA). Bei der canSNP-Typisierung werden 13-19 repräsentative verzweigungsspezifische SNPs analysiert. Auf der Grundlage der canSNP-Analyse kann *B. anthracis* in drei Hauptstämme unterteilt werden: A, B und C, die sich in Unterlinien mit typischer geografischer Verteilung unterteilen (Girault et al., 2014; Van Ert et al., 2007; Marston et al., 2011; Bruce et al., 2020). MLVA verwendet Tandem Repeats zur weiteren Unterteilung von *B. anthracis*-Isolaten durch Analyse von bis zu einunddreißig VNTR-Loci und ermöglicht die genauere Differenzierung von Stämmen mit identischem SNP-Genotyp (Rondinone et al., 2020).

Heute ist die Ganzgenomsequenzierung (WGS) die Methode der Wahl, um genomweite SNPs in *B. anthracis* zu identifizieren, was die Definition neuer genetischer Abstammungslinien ermöglicht, aber auch die Auflösung phylogenetischer Analysen bei Ausbruchssituationen erhöht.

Für die WGS mit anschließender bioinformatischer Analyse für Ausbruchsanalysen bieten sich die Illumina- und/ oder MinION -Plattformen an. DNA-Isolation und Erstellung von Libraries werden jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt.

Core genome multilocus sequence typing (cgMLST) ist eine Methode zur bakteriellen Subtypisierung, die WGS-Daten verwendet, um eine hochauflösende Stammcharakterisierung zu ermöglichen und steht für *B. anthracis* zur Verfügung (Abdel-Gil et al., 2021). Das Schema umfasst 3 803 Gene, die in *B. anthracis*-Genomen konserviert sind und die gesamte Phylogenie umspannen. Die cgMLST-Ergebnisse bestätigten die klassische canSNP-Gruppierung von *B. anthracis* in Hauptkladen und Subkladen. Die auf der Grundlage von cgMLST berechneten genetischen Abstände sind vergleichbar mit den Abständen aus der SNP-Analyse auf Ganzgenombasis. Die Anwendung des cgMLST-Schemas auf epidemiologisch verbundene Stämme in Ausbruchsgeschehen ermöglicht eine hochauflösende Stammgenotypisierung.

Eine linuxbasierte Pipeline zur automatischen Analyse von Gesamtgenomdaten für *B. anthracis* ist unter https://gitlab.com/FLI_Bioinfo/WGSBAC kostenfrei verfügbar.

3.3 Antibiotikaresistenz-Testung

Der § 12d der Tierärztliche Hausapothekenverordnung (TÄHAV) legt fest, dass die Empfindlichkeit eines bakteriellen Isolats gegen antibiotisch wirksame Substanzen nach national oder international anerkannten Verfahren zu erfolgen hat, falls diese verfügbar sind. Anerkannte Standards zur Durchführung der Empfindlichkeitstestung stellen sicher, dass die für einzelne Substanzen ermittelten Konzentrationswerte, bei denen Wachstumshemmung auftritt, zwischen Laboren vergleichbare Resultate ergeben.

Die Antibiotika-Empfindlichkeitstestung kann z.B. mittels Antibiotika-MHK-Teststreifen durchgeführt (MHK = minimale Hemmkonzentration = MIC; minimal inhibitory concentration).

E-test Streifen bieten eine einfachere Methode für die MIC-Bestimmung als das Mikrodilutionsverfahren und können auch unter S3 Bedingungen durchgeführt werden. Etests bestehen aus einem Plastikstreifen, der mit

einem Gradienten antimikrobieller Imprägnierung (mit einem MIC-Bereich von 15 zweifachen Verdünnungen) imprägniert ist. Sobald es auf eine Isolat-beimpfte Agarplatte aufgebracht ist, diffundiert das antimikrobielle Mittel und führt zu einem stabilen Konzentrationsgradienten im Medium. Nach der Inkubation der Kultur erscheint eine Hemmhofelypse. Diese berührt die MHK-Skala bei der Konzentration, bei der das getestete Antibiotikum das Bakterienwachstum hemmt. Dieser Wert stellt den MHK bzw. MIC-Wert dar.

Das EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) hat zwar keine Grenzwerte aber zur Orientierung MIC-Werte für *B. anthracis* gegenüber verschiedenen Antibiotikas zur Verfügung gestellt (<https://mic.eucast.org/>). Für einige Antibiotika sind in den CLSI Guidelines Grenzwerte zur Einstufung der Empfindlichkeit von *B. anthracis* verfügbar (CLSI, 2015).

Sollte im Einzelfall eine Antibiotikaresistenz-Testung eines Isolates sinnvoll und notwendig sein, so bietet das NRL an, diese Untersuchung nach Absprache (z.B. hinsichtlich auf die zu untersuchenden Antibiotika) am FLI durchzuführen.

Anhang

Nährmedien

Blutagar

Brucella-Agar (oder andere Blutagarbasis, siehe z. B. die folgende Rezeptur) mit Zusatz von 5 % defibriniertem Blut von Schafen, Pferden, Rindern oder Kaninchen. Weiter wird empfohlen:

Bacto-Pepton	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	2,0 g
Fleischextrakt	6,0 g
Aqua dest. Ad	1000,0 ml
pH = 7,2 ± 0,2	

TMSP-Agar

Standard-Agar	40,0 g
Trimethoprimlactat Salz	13,1 mg
Sulfamethoxazol	20,0 mg
Polymyxin B	30 000 Einheiten
Schafblut	50,0 ml
Aqua dest. Ad	1000,0 ml
pH 7,3 ± 0,2	

Die Zusätze werden als Sterilfiltrate präpariert und nach Abkühlung des autoklavierten Agarmediums auf 50 °C zugesetzt. Trimethoprim kann als 100-fache Stammlösung in Wasser angesetzt und bei -20 °C in Aliquots gelagert werden.

Eine 100-fache Lösung von Sulfamethoxazol kann durch Zusatz von 600 µl 10 % NaOH zu 100 ml Wasser und Erhitzung der Lösung auf 80 °C hergestellt werden.

Milzbrand

Anreicherungsbouillon für *B. anthracis/B. cereus* (Rassbach und Reissbrodt, 2002)

Basis	
Nutrient Broth (Difco, BD)	für 1 l
Tryptone (Difco, BD)	5,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	4,0 g
Sterilisation 15 min 121 °C	
pH 7,3 ± 0,1	
Supplemente (als sterile Lösungen zugeben)	
D-Glucose	2,0 g
Trimethoprim	0,0032 g
Sulfamethoxazol	0,016 g
Polymyxin B	0,020 g
Cycloheximid	0,200 g

Halbfestes Nährmedium zur Beweglichkeitsprüfung

Tetrazoliumsalze sind farblos, werden aber bei Bakteriumwachstum in die Zellen aufgenommen und zu einem roten Farbstoff (Formazan) reduziert. Die Beweglichkeit kann damit durch „Ausschwärmen“ der Bakterien auf dem Nährmedium sichtbar gemacht werden.

NB I- Bouillon	für 1 L
Standard-Agar	2,5 g
lösen, autoklavieren (15 min bei 121 °C)	
2,3,5,-Triphenyltetrazolium chlorid (steril zusetzen)	0,05 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

Kapseldarstellung

Kapselfärbung mit AzurB (Owen et al., 2013)

Färbelösung: 0,03 g Azur B (z.B. Fa. Sigma #A4043) in 3 ml 95%igem Ethanol oder Methanol lösen
anschließend Zugabe von 10 ml 0,01% KOH (0,23% finale Azure B Konzentration)

Färbelösung ist sofort einsetzbar

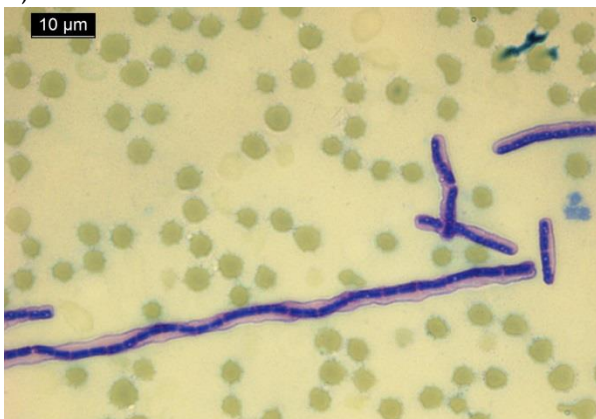
Haltbarkeit bei Raumtemperatur (dunkel) mind. 12 Monate

Für einen Direktausstrich einen Tropfen Blut auf ein Ende des Objektträgers bringen und mit Hilfe eines angeschliffenen Deckglases einen sehr dünnen Ausstrich bzw. ein Abklatschpräparat von Gewebeproben anfertigen. Die Kapselbildung kann auch durch Kultivierung in defibriniertem Pferde-, Rinder- oder Schafblut angeregt werden.

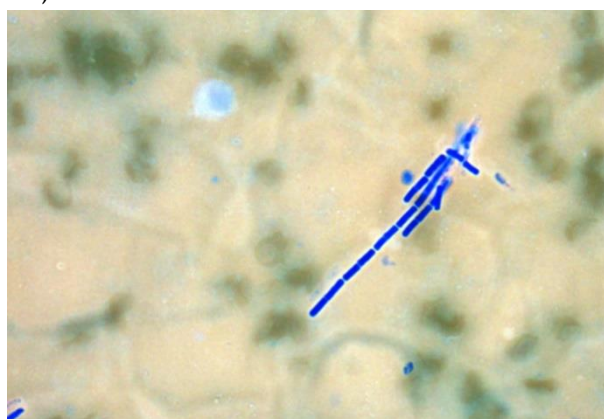
- Präparat lufttrocknen
- in absolutem Ethanol oder Methanol für 10 Minuten fixieren
- mit Azur B-Lösung 5 Minuten färben
- mit Leitungswasser abspülen, und trocknen lassen
- mikroskopische Beurteilung bei 1000-facher Vergrößerung

Ergebnis:

A)



B)



Kapselfärbung mit AzurB nach Kultivierung in defibriniertem Pferdeblut: *B. anthracis* (A, mit rosa angefarbter Kapsel) und *B. cereus* (B, ohne Kapsel).

Kapseldarstellung durch Tusche (nur aus Kulturmateriale)

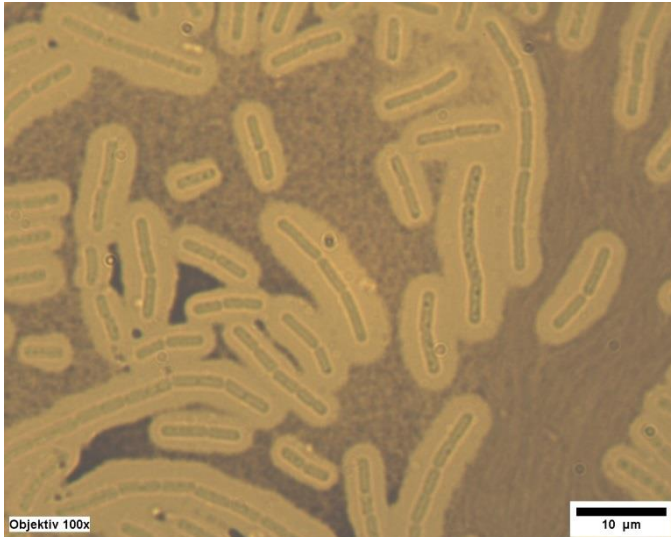
Der Kapselnachweis in Kulturen durch Tusche ist nur möglich, wenn diese auf bikarbonathaltigen Nährböden unter 5 bis 7%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert wurden.

- eine Öse Bakterienmasse von einer bikarbonathaltigen Agarplatte in 1 ml 10%ige Formaldehydlösung resuspendieren, 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen
- zentrifugieren 5 min, 13000 rpm
- Überstand verwerfen
- Sediment 1x mit aqua. dest. waschen und zentrifugieren, Überstand verwerfen
- ein Tropfen vom Sediment mit einem Tropfen Tusche in einem 1,5 ml-Tube mischen
- davon 1 Tropfen auf einen Objektträger übertragen und mit Deckglas abdecken
- Beurteilung bei 1000-facher Vergrößerung

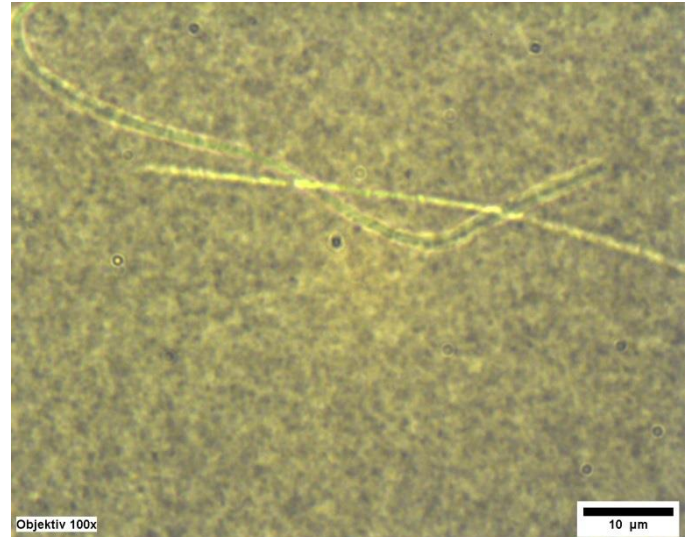
Milzbrand

Ergebnis:

A)



B)



Kapseldarstellung durch Tusche: *B. anthracis* (A, mit hell leuchtender Kapsel), *B. cereus* (B, ohne Kapsel)

Realtime-PCRs zum Nachweis von pathogenem *Bacillus anthracis*

TaqMan-Sonden PCR

Der Nachweis basiert auf der Amplifikation *B. anthracis*-spezifischer Sequenzabschnitte: dem Gen des protektiven Antigens auf Plasmid pXO1 sowie dem Gen des Kapselantigens auf Plasmid pXO2 (Ellerbroek, H. *et al.*, 2002).

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
BAPA- S		CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA
BAPA- R		CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT
	BAPA-TM	5'-FAM-CTCGAACTGGAGTGAAGTGTTACCGCAAAT BHQ-1-3'
CAP-S		ACGTATGGTGTTC AAGATTCATG
CAP-R		ATTTTCGTCTCATTCTACCTCACC
	CAP-TM	5'-FAM-CCACGGAATTCAAAAATCTCAAATGGCAT-BHQ-1-3'

Verdächtiges Koloniematerial (in 1 ml HPLC-Wasser resuspendieren, erhitzen bei 110 °C, 20 Minuten, filtrieren durch 0,2 µm Filter) kann direkt als PCR-Template eingesetzt werden. DNA-Isolierung (z. B. QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Invisorb Spin Tissue Mini Kit, InVitek;) entsprechend den Hinweisen der Hersteller.

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Fertig-Reaktionmix (z. B. Taqman Universal Mastermix #4304437, 2x)
7 µl	HPLC-Wasser
1,5 µl	je Primer (10 µM)
0,5 µl	Sonde (10 µM)
2 µl	Template

PCR-Bedingungen (MX3000 Stratagene):

Dekontamination bei 50 °C, 2 min; initiale Denaturierung bei 95 °C, 10 min; 50 Zyklen Amplifikation: 95 °C, 25 sek; 60 °C, 1 min.

TaqMan-Sonden-Multiplex PCR

Der Nachweis basiert auf der parallelen Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte aus drei unterschiedlich kodierenden Regionen: auf Plasmid pXO1, auf Plasmid pXO2 sowie dem auf dem bakteriellen Chromosom.

Charakteristische Parameter der PCR (modifiziert nach Wielinga *et al.*, 2011)

Zielgen	pXO1 Marker (Ödemfaktorgen <i>cya</i>)	pXO2 Marker (<i>capB</i> -Gen)	Chromosomaler Marker (Prophage lambdaBa03 -PL3)
Primerpaar	cyapri_f/ cyapri_r	caBpri2_f/ caBpri2_r	PL3_f/ PL3_r
Sonde	Tqpro_cya HEX	Tqpro_caB CY5	Tqpro_PL3 FAM

Primer und Sonden:

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
PL3_f		AAAGCTACAACTCTGAAATTTGTAAATTG
PL3_r		CAACGATGATTGGAGATAGAGTATTCTTT
	Tqpro_PL3	FAM-AACAGTACGTTTCACTGGAGCAAAATCAABHQ1
cyapri_f		AGGTAGATTTATAGAAAAAACATTACGGG
cyapri_r		GCTGACGTAGGGATGGTATT
	Tqpro_cya	Hex-CCACTCAATATAAGCTTTATTACCAGGAGCBHQ1
caBpri2_f		AGCAATGTTGGAGTGATTGTAAATG
caBpri2_r		AAAGTAATCCAAGTATTCACTTTCAATAG
	Tqpro_caB	CY5-AGGTCCCATAACATCCATATGATCTTCTAABHQ2a

Der chromosomale Marker PL3 wird als besonders spezifisch für *B. anthracis* angesehen (Agren *et al.*, 2013).

Milzbrand

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Fertig-Reaktionmix (z.B. TaqMan Environmental Mastermix, 2x)
7 µl	HPLC-Wasser
1,5 µl	je Primer (10 µM)
0,5 µl	Sonde (10 µM)
2 µl	Template

PCR-Bedingungen (z.B. MX3000 Stratagene, CFX96 Biorad, Pikoreal):

Dekontamination bei 50 °C, 2 min; initiale Denaturierung bei 95 °C, 10 min; 50 Zyklen Amplifikation: 95 °C, 25 sek; 60 °C, 1 min.

FRET-Sonden

Der Nachweis basiert auf der parallelen Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte aus drei unterschiedlich kodierenden Regionen: dem Gen des protektiven Antigens (pag) auf Plasmid pXO1, dem Gen des Kapselantigens (capC) auf Plasmid pXO2 sowie spezifischer genomischer Sequenzen auf dem *sasp*-Gen (small acid soluble spore protein). Der Nachweis der genomischen Sequenzen auf dem *sasp*-Gen allein ist nicht spezifisch für *B. anthracis*.

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
BAPA-S ³		CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA
BAPA-R ³		CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT
	BAPA-FL ¹	TGCGGTAACACTTCACTCCAGTTCTGA
	BAPA-LC ¹	Red 640 CCTGTATCCACCCTCACTCTTCCATTTTC-P
CapS ³		ACGTATGGTGTTCAGATTCATG
Cap A ^{**2}		GATTGCAAATGTTGCACCACTTA
	CapC-FL ⁺¹	TATTGTTATCCTGTTATGCCATTTGAGATTTTT
	CapC-LC ¹	Red640 AATCCGTGGTATTGGAGTTATTGTTCC- P
ANT-F ⁺²		GCTAGTTATGGTACAGATTTGCGAC
ANT-Amt ¹		CCATAACTAGCATTTGTGCTTTGAAT
	ANT-FL ¹	CAAGCAAACGCACAATCAGAAGCTAAG
	ANT-LC ¹	Red640 GCGCAAGCTTCTGGTGCTAGC-P

¹Beyer et al., 2003; ²Mauch, H. et al., 2008; ³Ellerbroek, H. et al., 2002

PCR-Ansatz:

4 μ l	Fertig-Reaktionmix (z. B. LighCycler: Lightcycler FastStart DNA Master Plus Hybprobe, Roche, 5x)
8,6 μ l	HPLC-Wasser
1 μ l	je Primer (10 μ M)
1 μ l	je Sonde (4 μ M)
2 μ l	Template

Literatur

- ABDEL-GLIL MY, CHIAVERINI A, GAROFOLO G, FASANELLA A, PARISI A, HARMSSEN D, JOLLEY KA, ELSCHNER MC, TOMASO H, LINDE J, GALANTE D. A Whole-Genome-Based Gene-by-Gene Typing System for Standardized High-Resolution Strain Typing of *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol.* 2021 Jun 18;59(7):e0288920. doi: 10.1128/JCM.02889-20. Epub 2021 Jun 18. PMID: 33827898.
- ÅGREN J, RADITIJO A HAMIDJAJA, TRINE HANSEN, ROBIN RUULS, SIMON THIERRY, HÅKAN VIGRE, INGMAR JANSE, ANDERS SUNDSTRÖM, BO SEGERMAN, MIRIAM KOENE, CHARLOTTA LÖFSTRÖM, BART VAN ROTTERDAM, AND SYLVIANE DERZELLE: In silico and in vitro evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences *Virulence* 4:8, 671-685; November 15, 2013
- BEYER, W., BARTLING, C., NEUBAUER, H., Zum Stand der Nachweisverfahren für *Bacillus anthracis* in klinischen und Umweltproben. *Tierärztliche Umschau* 58, 653-662 (2003)
- BROWN, E. R. and Cherry, W. B. (1955): Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. infect. Dis.* 96, 34-39.
- BRUCE SA, SCHIRALDI NJ, KAMATH PL, EASTERDAY WR, TURNER WC. 2020 A classification framework for *Bacillus anthracis* defined by global genomic structure. *Evolutionary applications* 13(5): 935-944.
- DEDIÉ, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.-J. und WEINKE, TH. (1993): Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung. In: Bakterielle Zoonosen bei Mensch und Tier, Kapitel 12 Milzbrand. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 181-197.
- ELLERBROEK, H., NATTERMANN, H., ÖZEL, M., BEUTIN, L., APPEL, B., PAULI, G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by realtime PCR. *FEMS Microbiol.Lett*, 2002; 214(1): 51-9.
- GIRAULT G, THIERRY S, CHERCHAME E, DERZELLE S. 2014. Application of High-Throughput Sequencing: Discovery of Informative SNPs to Subtype *Bacillus anthracis*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 05:9.
- HALLMANN, L. (1961): Ausgewählte Untersuchungsmethoden für das bakteriologische und serologische Laboratorium. In: Bakteriologie und Serologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Aufl.
- MARSTON CK, ALLEN CA, BEAUDRY J, PRICE EP, WOLKEN SR, PEARSON T, KEIM P, HOFFMASTER AR. 2011. Molecular Epidemiology of Anthrax Cases Associated with Recreational Use of Animal Hides and Yarn in the United States. *PLoS One* 6:e28274.
- MAUCH, H. PODBIELSKI, A, HERRMANN, A. KIEHL, E. MIQ 26 Teil I, 2008- Mikrobiologische-infektiologische Qualitätsstandards. ELSEVIER Urban & Fischer, München, Jena
- RONDINONE V, SERRECCHIA L, PARISI A, FASANELLA A, MANZULLI V, CIPOLLETTA D, GALANTE D. 2020. Genetic characterization of *Bacillus anthracis* strains circulating in Italy from 1972 to 2018. *PLoS One* 15:e0227875.
- REISSBRODT, R, A. RASSBACH, B.BURGHARDT,I. RIENÄCKER, H. MIETKE, J. SCHLEIF, H. TSCHÄPE, M. LYTE, AND P.H.WILLIAMS (2004): Assessment of a New Selective Chromogenic *Bacillus cereus* Group Plating medium and Use of Enterobacterial Autoinducer of Growth for Cultural Identification of *Bacillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 3795- 3798

- QI, Y., G. PATRA, X. LIANG, L.E. WILLIAMS, S. ROSE, R.J. REDKAR AND V.G. DE VECCHIO (2001) Utilization of the rpoB Gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of Bacillus anthracis. *Appl. Env. Microbiol.* 67, 3720-3727.
- OWEN, M.P., SCHAUWERS, W., HUGH-JONES, M.E., KIERNAN, J.A., TURNBULL, P.C.B, BEYER, W. A simple, reliable M'Fadyean stain for visualizing the Bacillus anthracis capsule simple, reliable M'Fadyean stain for visualizing the Bacillus anthracis capsule. *Journal of Microbiological Methods* 92 (2013) 264-269.
- PETER R. WIELINGA, RADITIJO A. HAMIDJAJA, JOAKIM ÅGREN, RICKARD KNUTSSON, BO SEGERMAN, MARTINA FRICKER, MONIKA EHLING-SCHULZ, ASTRID DE GROOT, JANE BURTON, TIM BROOKS, INGMAR JANSE, BART VAN ROTTERDAM; A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating B. anthracis virulent types *International Journal of Food Microbiology* 145 (2011) S137-S144.
- VAN ERT MN, EASTERDAY WR, HUYNH LY, OKINAKA RT, HUGH-JONES ME, RAVEL J, ZANECKI SR, PEARSON T, SIMONSON TS, U'REN JM, KACHUR SM, LEADEM-DOUGHERTY RR, RHOTON SD, ZINSER G, FARLOW J, COKER PR, SMITH KL, WANG B, KENEFIC LJ, FRASER-LIGGETT CM, WAGNER DM, KEIM P. 2007. Global genetic population structure of Bacillus anthracis. *PLoS One* 2:e461.
- WHO 2008: Anthrax in Humans and Animals, 4th edition., ISBN 978-92-4-154753-6
- CLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015
- Terrestrial Animal Health Code, World Organisation for Animal Health (WOAH), Chapter 8.1. Anthrax, online Version 2022
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, WOAH, Chapter 3.1.1. Anthrax, online, adopted in May 2018

Milzbrand

Tabelle 1: Einige Differenzierungsmerkmale zwischen *B. anthracis* und anderen *Bacillus* spp. (nach Dedie *et al.*, 1993, mod.)

	spezifische Tests				weniger spezifische Tests		
	Beweglichkeit	Hämolyse	Phagenlysis	Mäusepathogenität	Kolonieform	Wachstum in Bouillon	Penicillinempfindlichkeit
<i>B. anthracis</i>	-	keine Hämolyse (selten späte Vergrünung)	+	+ (bekapselte Stämme)	Matt glänzend oder trocken, flach, nicht pigmentiert	klar mit feinflockigem Bodensatz	+ (70 %)
<i>B. cereus</i>	+ (90 %*)	meist starke b-Hämolyse	-	± (25 bis 80 %*)	flach, rauh, rhizoid	trüb mit Sediment	-
<i>B. mycoides</i>	- (meist)	± (positiv: Pferdeblut; variabel: Schafblut)	-	- (10 %*)	Oberfläche stumpf	klar, anfangs mit Häutchen, das absinkt	-
<i>B. megaterium</i>	± (meist schwach beweglich)	b-Hämolyse	-	-	rund, glattrandig	trüb	+

* Zahl in Klammern: Prozentsatz der Stämme mit positiven Reaktionen

Tabelle 2: Wachstum und Koloniemorphologie von *Bacillus spp.* auf verschiedenen Nährmedien (37 °C, 20 - 24 h)

Nährmedien	TMSP-Agar		Blutagar		<i>B. cereus</i> -Supplement-Agar
	Wachstum	Hämolyse	Wachstum	Hämolyse	
<i>B. anthracis</i>	groß, weiß	∅	weiß	∅	groß, weiß
<i>B. cereus</i> -Wildstämme	groß, cremef.	+ (meist)	weiß	+	groß, meist türkis*, **
<i>B. thuringiensis</i>	weiß	+	weiß	+	helltürkises Zentrum weißer Rand **
<i>B. subtilis</i>	kein	-	weiß	+	k.W.
<i>B. mycoides</i>	grauweiß, fädig	+	weiß	+	k. W.
<i>B. lichenformis</i>	kein	-	hell	∅	kleine helltürkise Kol.
<i>B. megaterium</i>	kein	-	weiß	∅	Gehemmt, klein weiß bis cremefarben

*teilweise türkiser Hof um Kolonien ** ausnahmsweise weiß wachsende Kolonien möglich

Falldefinition - Milzbrand; *Bacillus anthracis*

Klinisches Bild

Milzbrand ist eine weltweit verbreitete Zoonose. Der Name Milzbrand bezieht sich auf die meist dunkel gefärbte und wie verbrannt aussehende Milz erkrankter Tiere. Am lebenden Tier ist Milzbrand selten mit Sicherheit festzustellen. Der Krankheitsverlauf kann perakut, akut oder chronisch sein. Aus den Körperöffnungen (Anus, Vulva, Mund, Nase) tritt dunkles, schlecht gerinnendes Blut, wobei auch Schling- und Atembeschwerden, Atemnot wegen Schwellung im Kehlgangsbereich (Milzbrandbräune) beobachtet werden können. Beim Menschen kommt Milzbrand vorwiegend als lokale Hauterkrankung (Hautmilzbrand) oder als systemische Erkrankung der Atmungs- (Lungenmilzbrand) und der Verdauungsorgane (Darmmilzbrand) vor.

Inkubationszeit: ca. 1 bis 14 Tage

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Bakteriologische und molekularbiologische Untersuchungen

Zusatzinformation

B. anthracis ist in der Lage, extrem widerstandsfähige Sporen zu bilden, welche unter natürlichen Bedingungen über Jahrzehnte lebensfähig und infektiös sind.

Gezielte Tätigkeiten mit dem Erreger müssen in Laboratorien der Sicherheitsstufe 3 erfolgen.

Differenzialdiagnose

Vergiftungen, Pasteurellose, Rauschbrand, Pararauschbrand

Epidemiologischer Zusammenhang

Haus- und Wildwiederkäuer sind hochempfindlich für Milzbrand. Schweine, Fleischfresser und auch Menschen (eher mäßig) und Vögel (Ausnahme Strauß) gelten als fast resistent.

Die Infektion erfolgt beim Tier vorwiegend über mit Milzbrandsporen kontaminiertes Futter.

Der Mensch infiziert sich vorwiegend durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren bzw. tierischen Produkten.

In Gebieten, in denen Milzbrandfälle beobachtet wurden, sollte bei jedem akuten Todesfall Milzbrand differenzialdiagnostisch berücksichtigt werden.

Verdachtsfall (Artikel 9 der Delegierten Verordnung 2020/689)

Folgende Kriterien gelten für die Definition „Verdachtsfall“:

- a) klinische Untersuchungen, Nekropsieuntersuchungen oder Laboruntersuchungen haben ergeben, dass klinische Anzeichen, Post-mortem-Läsionen oder histologische Befunde für diese Seuche sprechen,
- b) die Ergebnisse einer Diagnosemethode an einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren deuten auf die wahrscheinliche Präsenz der Seuche hin, oder
- c) ein epidemiologischer Zusammenhang mit einem bestätigten Fall wurde festgestellt.

Bestätigter Fall (Artikel 9 der Delegierten Verordnung 2020/689)

Folgende Kriterien gelten für die Definition „bestätigter Fall“:

- a) der Seuchenerreger wurde bei einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren isoliert,
- b) spezifische Antigene oder Nukleinsäuren des Seuchenerregers, die nicht infolge einer Impfung aufgetreten sind, wurden in einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren nachgewiesen, die klinische Anzeichen für die Seuche oder einen epidemiologischen Zusammenhang mit einem Verdachtsfall oder bestätigten Fall aufweisen, oder
- c) eine indirekte Diagnosemethode an einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren, die klinische Anzeichen für die Seuche oder einen epidemiologischen Zusammenhang mit einem Verdachtsfall oder bestätigten Fall aufweisen, hat zu einem positiven Ergebnis geführt, das nicht die Folge einer Impfung ist.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Erregernachweis durch Erregerisolierung und -identifizierung

Rechtsgrundlagen (in der jeweils gültigen Fassung)

Deutsches Recht

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) vom 22. Mai 2013
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 23. Mai 1991
- Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand vom 23. Mai 1991

EU-Recht

- Verordnung (EU) 2016/429 vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“), Anhang II „Liste der Seuchen“ (geändert durch Verordnung (EU) 2018/1629 vom 25. Juli 2018): zur Infektion mit *Burkholderia mallei* (Rotz)
- Verordnung (EU) 2017/625 vom 15. März 2017 zu amtlichen Kontrollen und anderen amtlichen Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 vom 3. Dezember 2018 „Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/687 vom 17. Dezember 2019 „Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 vom 17. Dezember 2019 „Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 vom 17. Dezember 2019 „Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen“
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/692 vom 30. Januar 2020 „Vorschriften für den Eingang von Sendungen von bestimmten Tieren, bestimmtem Zuchtmaterial und bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs in die Union und für deren anschließende Verbringung und Handhabung“
- Delegierte Verordnung (EU) 2023/361 vom 28. November 2022 „Vorschriften für die Verwendung bestimmter Tierarzneimittel zur Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen“