

Amtliche Methode und Falldefinition

Rotz

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differenzialdiagnostik	3
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 und Typisierung	6
3.2 Serologische Diagnostik	8
Anhang 1	9
Anhang 2	10
Anhang 3	16
Literatur.....	18
Falldefinition - Rotz; Infektion mit <i>Burkholderia mallei</i>	19

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Burkholderia (B.) mallei ist der Erreger des Rotzes (Malleus, engl. Glanders), einer oft chronisch und seuchenhaft verlaufenden Infektionskrankheit, die primär bei Einhufern auftritt. Esel, Maulesel und Maultiere sind am empfänglichsten, Pferde, Ziegen, Hunde, Katzen, Kamele und auch Menschen gelten als mittelgradig prädisponiert. Rinder und Schweine sind schwer zu infizieren während Ratten sowie Geflügel praktisch resistent sein sollen. Die Krankheit ist eine Kontaktzoonose und gilt als ansteckend für den Menschen.

1.2 Klinische Symptomatik

Rotz tritt in Form knotiger und geschwüriger Entzündungen in der Haut, in der Nasenschleimhaut und in den Lungen auf. Der Erreger wird von Tier zu Tier oder durch Zwischenträger (Futter, Streu, Putzzeug, Geschirr) übertragen. Die Eintrittspforte ist die unverletzte Schleimhaut. Rotz kommt bei Eseln und Maultieren überwiegend in der akuten, bei Pferden überwiegend in der chronischen Form vor. Beim Maultier beginnt der Rotz fast immer mit einer zeitweilig aussetzenden Lahmheit an einem der Hinterbeine. Bei der chronischen Form sind möglicherweise die Erscheinungen nicht erkennbar.

Klinische Formen:

Nasenrotz mit geschwürigen Veränderungen auf der Nasenschleimhaut und grünlich-gelbem Ausfluss oft nur auf einer Seite, trotz beidseitiger Entzündung.

Hautrotz mit Knoten in der Haut, die geschwürig aufbrechen.

Außerdem: Husten und Atembeschwerden (Kehlkopf- und Lungenrotz), zeitweiliges Nasenbluten;

Der chronische Rotz kann jahrelang bestehen.

Im Sinne des OIE-Codes ist Rotz eine Infektion von Equiden mit *B. mallei* mit oder ohne das Vorhandensein klinischer Anzeichen.

1.3 Differenzialdiagnostik

Die Melioidose ist eine durch *Burkholderia pseudomallei* verursachte Infektionskrankheit bei Mensch und Tier und ähnelt manchmal dem Rotz bei Pferden. Es handelt sich ebenfalls um einen Erreger der Risikogruppe 3. Der differenzialdiagnostischen Abgrenzung von *B. mallei* wird in den SOP der EU-RL als auch im OIE WOAH-Handbuch Rechnung getragen und deshalb werden entsprechende molekularbiologische Methoden auch in die Methodensammlung aufgenommen.

Bei Nasenrotz: Druse, Pocken, Tuberkulose, traumatische Geschwüre

Rotz

Bei Hautrotz: *Lymphangitis epizootica*, *Lymphangitis ulcerosa*, Sporotrichose

Bei Lungenrotz: Tuberkulose, Nocardiose, Botryomykose, parasitäre Veränderungen

1.4 Diagnostische Indikation

Handelsuntersuchungen; klinische Symptome, positive serologische Befunde 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

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

Beim lebenden Tier erfolgt die serologische Untersuchung von Serum.

Der direkte Erregernachweis kann bei akut erkrankten Tieren aus Nasensekret, Lungenauswurf und Hauteiter gelingen, weniger geeignet sind Kot, Genitalausfluss, Harn, Milch, Augensekret, Speichel und Blut.

Von frisch verendeten Tieren sollten pathologisch veränderte Organe, insbesondere eitrige Geschwüre und/oder bindegewebige Knoten in Leber, Lunge und Milz sowie den zugehörigen regionalen Lymphknoten untersucht werden.

2.2 Transport und Lagerung

Untersuchungsmaterial wird als „Biologischer Stoff, Kategorie B“ UN3373 umgehend vorschriftsmäßig in dicht schließenden Behältnissen entsprechend den Gefahrgutvorschriften für Straße und Eisenbahn (ADR), bzw. im Luftverkehr (IATA-DGR) in der jeweils gültigen Fassung mit Vorbericht und Untersuchungsantrag an die Untersuchungseinrichtung geschickt.

Während des Transportes und evtl. notwendig werdender kurzzeitiger Lagerung ist das Material bei Zimmertemperatur aufzubewahren.

Bei kontaminiertem Untersuchungsmaterial soll sich eine dreistündige Aufbewahrung dieses Materials in PBS, dem 1000 IE Penicillin/ml zugesetzt wurde, bei 37 °C günstig auf die Nachweissicherheit auswirken.

Isolate von *B. mallei* müssen als Kategorie A „Infektiöser Stoff, gefährlich für Menschen“ UN2814 gem. den entsprechenden Vorschriften versandt werden.

Die Proben sind mit dem entsprechenden Einsendeformular 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/oie-und-nrl-fuer-rotz/>

3. Untersuchungsgang

Dazu siehe auch:

- *— Terrestrial Animal Health Code (2021), OIE, online Version 15.10.2021
- *— Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021; Chapter 3.6.11 Glanders and melioidosis (version adopted in May 2018)

Vorsichtsmaßnahmen

B. mallei ist ein Erreger der Risikogruppe 3. Das Arbeiten mit potentiell *B. mallei*-infiziertem Material und mit *B. mallei*-Kulturen in einer Untersuchungseinrichtung ist genehmigungspflichtig und kann nur in Laboratorien der Schutzstufe 3 durchgeführt werden.

3.1 Erregernachweis und Typisierung

Grundsätzlich ist beim Auftreten klinischer Symptome (z. B. Nasensekret, Lungenauswurf, eitrige Hautveränderungen) die Möglichkeit eines direkten Erregernachweises gegeben. Bei chronischem Krankheitsverlauf, der in der Regel ohne klinisch erkennbare Symptome auftritt, gibt es allerdings am lebenden Tier keine sichere Methode, den Erreger direkt nachzuweisen. Eine *post mortem* Untersuchung von inneren Organen wie Lunge, Leber und Milz auf das Vorhandensein von Rotz-typischen Veränderungen ist in diesem Fall unerlässlich, um den Erreger im veränderten Gewebe zu identifizieren.

Der direkte kulturelle Nachweis des Erregers des Rotzes ist schwierig, jedoch als beweisend anzusehen und ist daher in jedem Fall durchzuführen.

3.1.1 Kulturelle Untersuchung

Von den genannten Probenahmestellen werden Objektträgerausstrich- oder Abklatschpräparate angefertigt und nach Gram gefärbt. *B. mallei* ist ein kleines gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium von 0,5 x 1,5 (bis 4) µm Größe mit meist abgerundeten Enden. An den Polen fällt eine intensivere Anfärbung auf.

Für die Anzucht wird Blutagar mit 3 - 4 % Glycerinzusatz empfohlen.

Bei kontaminierten Proben hat sich der Zusatz von Medien mit Substanzen, die das Wachstum grampositiver Organismen hemmen (z. B. Kristallviolett, Proflavin), als nützlich erwiesen, ebenso wie die Vorbehandlung mit Penicillin (1000 Einheiten/ml für 3 Stunden bei 37 °C).

Ein selektiver Nähragar kann das Wachstum von Begleitflora hemmen (Kinoshita et al., 2019) s. Anhang 3

3.1.2 Identifizierung

B. mallei bildet nach 48 bis 72 Stunden tautropfenförmige, glatte, durchscheinende, runde Kolonien, die bei weiterer Bebrütung einen leicht grau-gelblichen, schleimig-fadenziehenden Belag bilden. Hämolyse und Pigmentbildung werden nicht beobachtet.

B. mallei in Kultur ist relativ pleomorph, je nach Alter der Kultur variiert seine Größe und Lagerung. In ganz frischen Kulturen ist es kokkoid; Bakterien aus älteren Kulturen sind mitunter keulen- oder knospenförmig und können durch Vakuolen ein körniges Aussehen haben. Sie sind meist einzeln gelagert, in älteren Kulturen sind die Stäbchen länger und täuschen aneinandergelagert mitunter fädige Strukturen vor. Verdächtige Kolonien können mittels PCR (s. molekulare Nachweisverfahren) schnell identifiziert werden. Beweglichkeitsprüfung auf halbfesten Nährmedien - *B. mallei* ist unbeweglich, *B. pseudomallei* ist beweglich. Die biochemische Aktivität von *B. mallei* ist relativ gering. Gelatine wird verflüssigt, Nitrat reduziert, Xylose, Glycin und Arabinose werden hydrolysiert. Bei längerer Kultivierung können sich diese Eigenschaften durch die Bildung von Rauformen eventuell verändern.

Kommerzielle Tests für die biochemische Identifizierung von *B. mallei* sind nicht verfügbar.

B. mallei Isolate können mit MALDI-TOF MS identifiziert werden, wenn entsprechende Referenzspektren in der Datenbank vorhanden sind (Karger et al., 2012). Die Präparation erfolgt mit dem Ethanol-Extraktionsverfahren (entsprechend dem Protokoll der Fa. Bruker Daltonics). Nach 20 min in Ethanol sind die Burkholderien abgetötet und die übliche Präparation kann gefahrlos erfolgen.

3.1.3 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) gibt keine Grenzwerte für die Empfindlichkeit von *Burkholderia mallei* gegenüber Antibiotika vor. Für einige Antibiotika sind jedoch in den CLSI Guidelines MIC Grenzwerte zur Einstufung der Empfindlichkeit von *B. mallei* und *B. pseudomallei* 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.

3.1.4 Molekulare Nachweisverfahren, Genotypisierung, Sequenzierung und Bioinformatik

Die PCR-Diagnose von Rotz erfolgt anhand von DNA, die aus Gewebe oder Abstrichen oder von Kulturmaterial gewonnen wird. Die Realtime-PCRs zur Detektion von *B.mallei*, *B.pseudomallei* sowie des *B.pseudomallei*-Komplexes (*B.mallei*, *B.pseudomallei*, *B.thailandensis*) sind vom EU-Referenzlabor (<https://sitesv2.anses.fr/en/minisite/equine-diseases/sop>) vorgegeben (Anhang 1). Diese Methoden ermöglichen die sichere Unterscheidung von *B. mallei* und *B. pseudomallei*, der bei Pferden eine dem Rotz sehr ähnliche Erkrankung (sog. Pseudorotz) hervorrufen kann.

Eine Genotypisierungsmethode für *B. mallei* ist die PCR-basierte Multilocus-Analyse mit variabler Anzahl tandem repeats (VNTRs) Analyse (MLVA). MLVA verwendet Tandem Repeats zur Unterteilung von *B. mallei*-Isolaten durch Analyse von bis zu 23 VNTR-Loci (U'Ren et al, 2007). Die Methode bietet ein hohes Maß an

Auflösung zwischen *B. mallei*-Isolaten und kann für Ausbruchsanalysen und die Aufdeckung von Infektionsketten angewendet werden (Singha et.al.2021).

Neuerdings sind NGS-basierte Methoden verfügbar und ermöglichen einen Vergleich von Isolaten für die Analyse von phylogenetischen und epidemiologischen Zusammenhängen. Für Gesamtgenomsequenzierungen bieten sich die z.B. Illumina- und/ oder MinION-Plattformen an, wobei die DNA-Isolation und Erstellung von Libraries nach Herstellerangaben durchgeführt werden sollte. Da *B. mallei*-Genome einen hohen GC-Gehalt aufweisen, sollte die Tagmentierungs- und Denaturierungszeit während der Amplifizierung für Illumina-Libraries verdoppelt werden. Die Feintypisierung der Stämme basiert auf Einzelnukleotidänderungen (SNPs) und kann anhand der Sequenzierungs-Reads oder assemblierten Genome mit den frei verfügbaren Programmen snippy oder Parsnp erfolgen (Seeman T; Treangen et al., 2014). Diese Gesamtgenom-SNP-Analyse spiegelt die MLVA Ergebnisse wieder und eignet sich für weitergehende phylogenetische Analysen von Ausbruchstämmen.

Des Weiteren steht am NRL ein *B.mallei*-spezifisches cgMLST-Schema zur Verfügung, das als Ergänzung zu vorgenannten Analysen angewendet werden kann (Brangsch et al., 2022).

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

3.2 Serologische Diagnostik

Für Einfuhruntersuchungen ist die KBR durchzuführen. Im internationalen Verkehr mit Drittländern gelten die Einfuhrbestimmungen des jeweiligen Landes. In der jeweils gültigen Fassung des „Manual of Standards For Diagnostic Tests and Vaccines“ sind die gültigen Testmethoden für den internationalen Handel beschrieben.

3.2.1. Komplementbindungsreaktion (Anhang 2)

Die KBR ist eine sehr sensitive Nachweismethode für Rotz. Bei einer Erkrankung treten ab dem 12. bis 14. Tag p.i. positive Ergebnisse auf. Infektionen mit Pseudomonaden, besonders *B. pseudomallei*, sind serologisch nicht sicher von *B. mallei*-Infektionen zu trennen. Auch Infektionen mit *Actinobacillus lignieresii* sowie *Streptococcus equi* oder anderen können zu serologischen Kreuzreaktionen in der KBR führen. Esel und Maultiere zeigen häufiger antikomplementäre Reaktionen in der KBR.

3.2.2. Weitere serologische Untersuchungsverfahren

Für Abklärungsuntersuchungen von positiven KBR-Befunden ohne vorherige Malleinisierung wurde am Nationalen Referenzlabor für Rotz ein Westernblot-Verfahren etabliert (Elschner *et al.*, 2011). Für Abklärungsuntersuchungen wurde der ID Screen Glanders Double Antigen Multispecies ELISA (GLANDA ELISA) der Firma IDvet zugelassen.

Das quantitative Verhalten spezifischer *B. mallei*-Antikörper ist im Krankheitsverlauf vielfachen Schwankungen unterworfen und unterliegt keiner deutlichen Gesetzmäßigkeit. Aus diesem Grunde sind mehrere zeitlich versetzte serologische Untersuchungen zur Diagnosefindung durchzuführen.

Anhang 1

Die PCR-Diagnose von Rotz erfolgt anhand von DNA, die aus Gewebe oder Abstrichen oder von Kulturmaterial gewonnen wird.

Die Realtime-PCRs zur Detektion von *B.mallei*, *B.pseudomallei* sowie des *B.pseudomallei*-Komplexes (*B.mallei*, *B.pseudomallei*, *B.thailandensis*) nach SOP des EU-Referenzlabores (<https://sitesv2.an-ses.fr/en/minisite/equine-diseases/sop>):

Zielgen	Primer u. Sonde	Sequenz (5' - 3')	Referenz
<i>B. mallei</i> (<i>flip</i>)	fliP forw fliP rev fliP probe	CCC ATT GGC CCT ATC GAA G GCC CGA CGA GCA CCT GAT T FAM-CAG GTC AAC GAG CTT CAC GCG GAT C-TAMRA	Tomaso <i>et al.</i> , 2006
<i>B. pseudomallei</i> (<i>orf11</i>)	orf11 forw orf11 rev orf11 probe	ATC GCC AAA TGC CGG GTT TC CAA ATG GCC ATC GTG ATG TTC FAM -TCG GCG AAC GCG ATT TGA TCG TTC-TAMRA	Thibault <i>et al.</i> , 2004
<i>B. pseudomallei</i> complex (<i>aroA-B.mallei</i> , <i>B.pseudomallei</i> , <i>B.thailandensis</i>)	aroA forw aroA rev aroA probe	CCG CTC GTG AAG GCG AAG CGC CAT CAG CTT GAT CGT GA FAM -CGA GCG TCG TCG AGA TCG-TAMRA	Laroucau <i>et al.</i> , 2021

Zur Kontrolle ist das Mitführen einer Extraktionskontrolle sowie einer internen PCR-Kontrolle empfehlenswert. Geeignet sind z.B. das Mitführen einer Lambda-DNA (Tomaso et al., 2006) oder kommerzielle Systeme (z. B. IPC Diagenode, DICD-YD-L100).

Präparation des PCR-Ansatzes z.B. mit FAM/IPC-System:

Reagenz	Volumen pro Well		Endkonzentration
Master Mix Buffer (2X) *	10 µL		1x
System 1 - forw (20 µM)	0.5 µL	oder 1,4 µL des entsprechenden Mix	0.5 µM
System 1 - rev (20 µM)	0.5 µL		0.5 µM
System 1 - probe (5 µM) FAM	0.4 µL		0.1 µM
z.B. IPC Diagenode (10X) VIC	2 µL		1x
H ₂ O	1,6 µL		/
Volumen pro Well	15 µL		
Test-DNA	5 µL		/
Endvolumen	20 µL		/

*z. B. TaqMan® Fast advanced Master (Applied Biosystems # 4444557)

PCR-Programm: 50 °C für 2 min (UNG-Aktivierung), 95 °C für 20 s (Denaturierung), 45 Zyklen (95 °C 3 s, 60 °C 30 s) (Denaturierung, Hybridisierung, Elongation, Auslesen).

Anhang 2

Komplementbindungsreaktion (KBR)

Vorgeschriebenes Testverfahren für Handelsuntersuchungen
Empfehlung zur Durchführung der KBR in der Mikro-Methode

1. Materialien und Reagenzien

- KBR-Malleus-Antigen, zugel. nach § 17c TierSG (z. B. Fa. C.c.pro GmbH, Oberdorla, Zul.-Nr.BFAV-B349)
- Kontrollserum, positiv, zugel. nach § 17c TierSG (z. B. Fa. C.c.pro GmbH, Oberdorla, Zul.-Nr.BFAV-B349)
- Kontrollserum, negativ
- Komplement (Kompl) (z.B. ID.vet, Grabels, Frankreich)
- Ambozeptor (Amb) (z.B. ID.vet, Grabels, Frankreich)
- KBR-Puffer (KBRP) (z.B. ID.vet, Grabels, Frankreich)
- Hammelblut (z. B. stabilisierte 50%ige Suspension, z.B. Boehringer Ingelheim Therapeutics, Ochsenhausen)
- Mikrotiterplatten

Komplement und Ambozeptor sind zu titrieren.

Das EU-Referenzlabor empfiehlt die Verwendung einer 2%igen Erythrozytensuspension und den Einsatz von 5x H50 Komplementeinheiten.

2. Durchführung

2.1 Ambozeptor-Titration (nach EU-Referenzlabor)

- Herstellung einer 1/250 Verdünnung des Ambozeptors woraus weitere Verdünnungen in Rörchen hergestellt werden: z.B.

Amb. Verd.	Rö	µl KBRP vorlegen	Herstellung der Ambozeptorverdünnung
1/250	1	996	996 µl KBRP + 4 µl Ambozeptor
1/500	2	400	400 µl + 400 µl KBRP
1/1000	3	500	500 µl + 500 µl KBRP
1/2000	4	200	200 µl + 200 µl KBRP
1/3000	5	200	100 µl + 200 µl KBRP
1/4000	6	200	200 µl + 200 µl KBRP
1/5000	7	400	100 µl + 400 µl KBRP
1/6000	8	500	100 µl + 500 µl KBRP

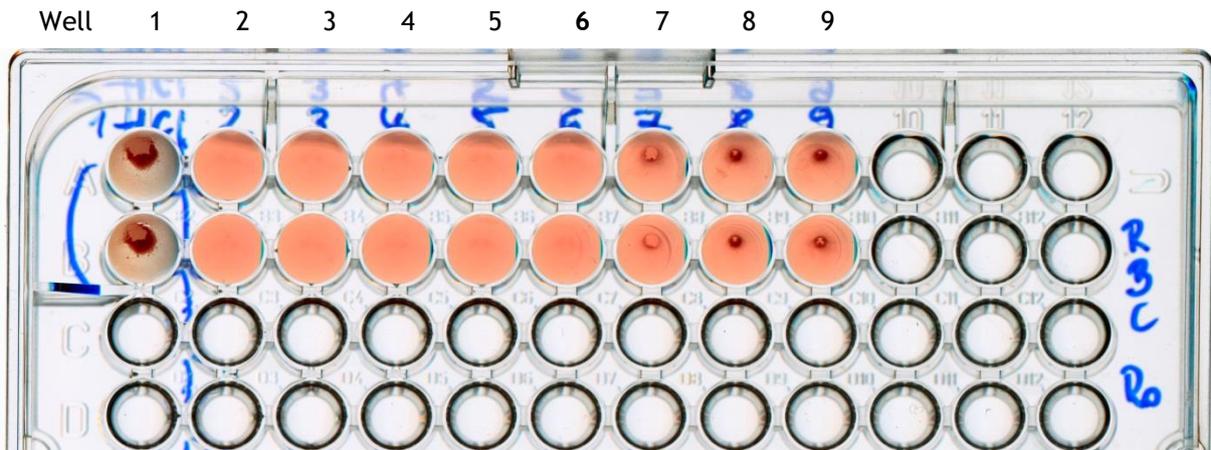
- Herstellung einer Komplementverdünnung im Überschuss (z. B. 1/10: 450 µl KBRP + 50 µl Komplement)
- Herstellung einer Erythrozyten-Lsg (Ery) 2 %
- Jede Präparation im Doppelansatz auf Platte übertragen:

Wells	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	HS*								
Amb. Verdünnung 1:	250	250	500	1000	2000	3000	4000	5000	6000
Verdünnter Amb. (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
KBRP (µl)	75	50	50	50	50	50	50	50	50
Kompl. 1/10 (µl)	—	25	25	25	25	25	25	25	25
Ery 2 % (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25

* HS = Ambozeptor-Kontrolle.

Rotz

- Platte schütteln, bei 37 °C für 30 min inkubieren
- Zentrifugieren 3,000-6,000 ms⁻² (ca. 300-600 g) 5-10 min.
- Auswertung:
Hämolytisches System: keine Hämolyse
Die höchste Verdünnung, die 100 % Hämolyse zeigt repräsentiert eine 100 % hämolytische Einheit.
In der KBR werden zwei hämolytische Einheiten eingesetzt, d.h. das Doppelte der bestimmten Menge.
Beispiel: die 1/3000 Verdünnung (Well 6, s. Abbildung) ist die höchste Verdünnung, die 100 % Hämolyse zeigt. Die zu nutzende Verdünnung ist deshalb 1: 1500.



2.2 Komplement-Titration (nach EU-Referenzlabor)

- Herstellung einer 1/100-Verdünnung des Komplements (K) in Röhrchen mit KBRP z.B. 0.05 ml Komplement in 5 ml KBRP.
- Herstellung einer Verdünnungsreihe wie unten:

Rö. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Hämolysekontrolle		
														H100	H0	
K Verdünnung (%)	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8			
K Verd. [K 1/100 + KBRP] (Total vol. = 200 µl)	K (1/100) (µl)	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	400	0
	KBRP (µl)	160	150	140	130	120	110	100	90	80	70	60	50	40	0	0
Verd. Antigen (µl)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
KBRP (µl) (Anstelle des Serums)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	0	400

- Röhrchen schütteln, ins Wasserbad 37 °C ± 2 °C für 30 min.
- Herstellung Hämolytisches System (HS), 20 min vor Gebrauch, bei RT
- Verteilung von 400 µl HS je Röhrchen

- Röhrchen schütteln, ins Wasserbad 37 °C, für 30 min.
- Sofort danach zentrifugieren bei 600 g für 5 bis 10 min.
- Auswertung:

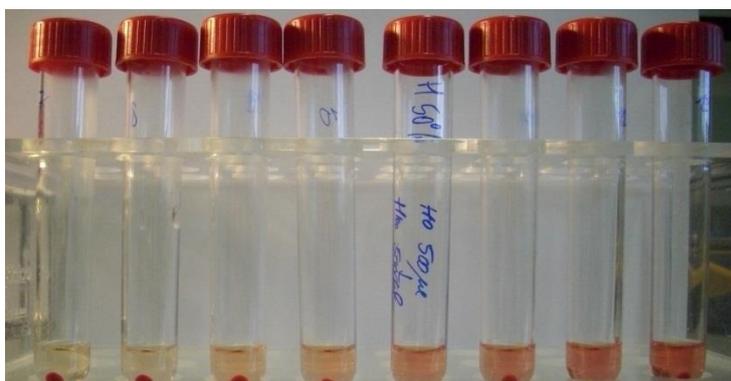
Herstellung einer 50 % Hämolyse-Kontrolle: Mixen von 500 µl des Überstandes des Röhrchens mit 0 % Hämolyse mit 500 µl des Überstandes des Röhrchens mit 100%. Dieses Röhrchen (Farbe des Überstandes) ist die H50 Kontrolle zum Ablesen des H50-Röhrchens.

Berechnung der Menge des Komplements, welches notwendig für den Test ist: z. B.

Eine Platte = 100 wells je 25 µl des verdünnten Komplements. D.h. 2500 µl für eine Platte

Die 50 % hämolytische Einheit wurde in Röhrchen 11 (s. Abbildung: 140 µl Komplement in 1/100 Verdünnung) gefunden.

Rö 7 8 9 10 H50% 11 12 13



KBR nutzt 5x H50 Einheiten, d.h. 87,5 µl von Komplement verdünnt in 2412,5 µl KBRP sind für ein Endvolumen von 2500 µl nötig. Das entspricht einer Komplementverdünnung von: 1:28,6 (gerundet 1:30; S. Formel zur Berechnung).

Formel zur Berechnung für 2500 µl Komplement in der richtigen Verdünnung:

$$\frac{140}{200} \times \frac{1}{100} \times 5 \times 25 \times 100 = 87,5 \mu\text{l}$$

Diagramm zur Berechnung:

- Das Nennwert 140 im Bruch $\frac{140}{200}$ ist das **Volumen des 1/100-verd. Kompl im ermittelten Rö Nr. 11**.
- Das Nennwert 200 im Bruch $\frac{140}{200}$ ist das **Volumen des Kompl im ermittelten Rö Nr. 11**.
- Der Nennwert 1 im Bruch $\frac{1}{100}$ ist **5 H50 Einheiten**.
- Der Nennwert 100 im Bruch $\frac{1}{100}$ ist die **Vorverdünnung**.
- Die Zahl 5 ist die **Zahl Wells**.
- Die Zahl 25 ist die **Zahl Wells**.
- Die Zahl 100 ist die **Zahl Wells**.
- Das Ergebnis $87,5 \mu\text{l}$ ist die Menge, die **Verdünt mit 2412,5 µl KBRP** wird.

2.3 Probenvorbereitung

Verunreinigte und hämolytische Seren sind zur Untersuchung nicht geeignet.

Serumproben und Antigen auf Raumtemperatur erwärmen.

Vor der Untersuchung sind alle zu untersuchenden Proben einschließlich Kontrollseren im Wasserbad in entsprechender Verdünnung wie folgt zu inaktivieren:

Serumverdünnung	Tierart	Temp. (°C)	Zeit (min)
1 : 5	Pferd	58 - 60	30
1 : 5	Maultier, Maulesel, Esel	63 ± 1	30

2.4 KBR-Ansatz

In der folgenden Tabelle werden die Arbeitsschritte für eine Probe und ein Antigen als Modell dargestellt.

KBR-Schritte - Proben Tag 1

Arbeits-schritte		Well								
		1 (SK)	2 1 : 5	3 1 : 10	4 1 : 20	:	:	10 1:		
1. KBR-Puffer	(µl)	25	-	25	:	:	:	:		
2. Serum	(µl)	25	25	25	:	:	:	:		
3. Titration des Serums von 3 nach 10 (verwerfen von 25 µl aus dem Well 10)										
4. Antigen	(µl)	-	25	25	:	:	:	:		
5. Komplement	(µl)	25	25	25	:	:	:	:		

Bei der Durchführung des KBR-Ansatzes sind jeweils folgende Kontrollansätze mitzuführen:

- a. Kontrolle der antikomplementären Wirkung des Serums (Serumkontrolle SK), angesetzt in Well 1:
Bewertung: 100 % Hämolyse

- b. Kontrollen des Antigens

KBR-PUFFER:	25 µl
Antigen:	25 µl
Komplement:	25 µl
HS Tag 2:	50 µl

Bewertung: 100 % Hämolyse

- c. Kontrollen des Komplements (nach Herstellerangaben ggf. titrieren)

KBR-PUFFER:	50 µl
Komplement:	25 µl
HS Tag 2:	50 µl

Bewertung: 100 % Hämolyse

d. Kontrolle des Hämolytischen Systems (HS)

KBR-PUFFER:	75 µl
HS Tag 2:	50 µl

Bewertung: 0 % Hämolyse

Platte schütteln und 18 bis 24 h bei $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ inkubieren.

Tag 2: Platten auf Raumtemperatur erwärmen

Herstellung des Hämolytischen Systems (HS)

Verdünnung des Ambozeptors nach Titrationsergebnis in KBR-Puffer und Mischen mit der Erythrozytensuspension im Verhältnis 1:1. Inkubation des HS für 30 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad.

Vortemperierung der KBR-Platten bei 37 °C .

KBR-Schritte Proben Tag 2

6. HS	(µl)	50	50	50	:	:	:	:		
Schütteln der Platten und Inkubation 15 - 30' bei $+37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ im Brutschrank in einer feuchten Kammer. Hämolysekontrolle! Inkubation abbrechen, wenn die Komplementkontrollen mit 2 und 1 Einheiten eine komplette Hämolyse zeigen. Zentrifugation 5 min bei 2000 Upm										

Auswertung

Bei der Ablesung wird unterschieden:

100 % Hämolysehemmung = 4 (++++)

75 % Hämolysehemmung = 3 (+++)

50 % Hämolysehemmung = 2 (++)

25 % Hämolysehemmung = 1 (+)

keine Hämolysehemmung = negativ

Titerbeurteilung: Gemäß OIE Handbuch (2020, online Version) werden die Titer wie folgt beurteilt:

Eine Serumprobe in der Verdünnung von 1:5

mit 100 % Hämolyse ist negativ,

mit 25 - 75 % Hämolyse ist verdächtig

ohne Hämolyse ist positiv.

Anhang 3

Mallei-Selektiv-Agar (Kinoshita et al., 2019)

Mit dem Medium wird *Burkholderia mallei* aus klinischem Untersuchungsmaterial isoliert.

Außerdem wachsen *Burkholderia pseudomallei* und *Burkholderia thailandensis* sowie *Herbaspirillum huttiense*

Folgende Bakterien werden im Wachstum gehemmt:

Chryseobacterium gleum, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter histidinovorans*, *Paenibacillus species*, *Bacillus species*, *Enterobacter cloacae*, *Rhizobium radiobacter*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea agglomerans*, *Staphylococcus species*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Sphingomonas species*, *Rhizobium species*, and *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas koreensis*, und *Pantoea agglomerans*;

1. Reagenzien

Substanz	Quelle	Bemerkung
Wasser		
Agar	z.B. Roth	
Glycerin	z.B. Roth	Kohlenstoffquelle
Trypton	z.B. BD	Pepton
Proteose pepton no.3	z.B. OXOID	Pepton
NaCl	z.B. Roth	Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks
Na pyruvat	z.B. VWR	Schutz von verletzten Bakterien
MgSO ₄	z.B. VWR	Erhöhung der Enzymaktivität
Kristallviolett	z.B. AppliChem	Wachstumshemmung von einigen Gram(+)-Bakterien
Cycloheximid	z.B. Th. Geyer	Antimykotikum
Ticarcillin Di-Natriumsalz	z.B. Th. Geyer	Antibiotikum, 15 mg als Ticarcillin
Fosfomycyn Natrium	z.B. Th. Geyer	Antibiotikum, 150 mg als Fosfomycyn
Polymyxin B Sulfat	z.B. Th. Geyer	Antibiotikum

2. Herstellungsvorschrift (für 1000 ml) ca. 60 Platten a 15 ml

Substanz	Menge	Bemerkung
Agar	15 g	
Proteose pepton no.3	5 g	
Trypton	10 g	
MgSO ₄	0.25 g	
Na pyruvat	1 g	
NaCl	5 g	
Glycerin	40 ml	
Kristallviolett	3 mg	3 ml von 0,1% w/v Kristallviolett in destilliertem Wasser

Cycloheximid	50 mg	5 mL from 1% w/v Cycloheximid in absolutem Ethanol
Wasser	960 ml	

Die Mischung 15 Minuten lang bei 121 °C sterilisieren.

Nach Abkühlung auf 45 °C Zugabe von:

Ticarcillin Di-Natriumsalz	16.7 mg	668 µL der 25 mg/ml Stammlösung
Fosfomycyn Natrium	197.8 mg	1520 µL der 130 mg/mL Stammlösung
Polymyxin B Sulfat	40,000 U	400 µL der 100,000 units/ mL Stammlösung

3. Haltbarkeit der Platten

Gebrauchsfertige Platten sind kühl gelagert (2 - 10 °C) mind. 3 Monate verwendbar.

Literatur

- Elschner et al., 2011. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet Res* 7,4.
- Naureen et al., 2007 Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J Vet Diagn Invest.* 2007 Jul; 19(4):362-7.
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021; Chapter 3.6.11 Glanders and melioidosis (version adopted in May 2018)
- Tomaso et al., 2006. Real-time identification of *Burkholderia pseudomallei* with a 5' nuclease real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Clin. Chem.*, 52, 307-310.
- Elschner et al., 2019. *PLoS One.* 2019 Apr 5;14(4):e0214963. doi: 10.1371/journal.pone.0214963. eCollection 2019.
- Laroucau et al., 2021. A genetic variant of *Burkholderia mallei* detected in Kuwait: consequences for the PCR diagnosis of glanders. *Transbound. Emerg. Dis.* 68:960-963
- Thibault et al., 2004. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J Clin Microbiol.* Dec;42(12):5871-4.
- Karger et al., 2012. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing, *BMC, Microbiology*, 2012,12:229.
- U'Ren et al., 2007. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol* 7, 23 (2007).
- Singha et al., 2021. Molecular Typing of *Burkholderia mallei* Isolates from Equids with Glanders, India. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(6):1745-1748.
- Seeman, T. Snippy. Available online: <https://github.com/tseeman/snippy>
- Treangen et al., 2014. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol*, 2014, 15:524.
- Kinoshita Y, Cloutier AK, Rozak DA, Khan MSR, Niwa H, Uchida-Fujii E, Katayama Y, Tuanyok A. A novel selective medium for the isolation of *Burkholderia mallei* from equine specimens. *BMC Vet Res.* 2019 May 7;15(1):133. doi: 10.1186/s12917-019-1874-0 . PMID: 31064357 ; PMCID: PMC6505306.
- Brangsch, H.; Saqib, M.; Sial, A.u.R.; Melzer, F.; Linde, J.; Elschner, M.C. Sequencing-Based Genotyping of Pakistani *Burkholderia mallei* Strains: A Useful Way for Investigating Glanders Outbreaks. *Pathogens* 2022, 11, 614. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060614>
- Terrestrial Animal Health Code, World Organisation for Animal Health (WOAH), Chapter 12.10 Infection with *Burkholderia mallei* (Glanders), online Version 2022
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, WOA, Chapter 3.6.11 Glanders and melioidosis, online, adopted in May 2018
- 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.

Falldefinition - Rotz; Infektion mit *Burkholderia mallei*

Klinisches Bild

Rotz ist eine akut bis chronisch verlaufende Infektionskrankheit der Einhufer, die mit folgenden klinischen Bildern auftritt:

- Hautrotz: knotige und ulzerierende Entzündungen in der Haut
- Nasenrotz: ulzerierende Veränderungen der Nasenschleimhaut, begleitet von oft einseitig austretendem grünlich gelben Nasenausfluss
- Kehlkopf- oder Lungenrotz: Husten und Atembeschwerden

Bei Pferden verläuft die Erkrankung oft chronisch oder latent, was diese Tiere zu gefährlichen Erregerausscheidern macht. Esel, Maulesel und Maultiere erkranken vorwiegend akut bis subakut. Empfänglich sind außerdem Kamele, Ziegen, Hunde und Katzen. Rotz ist eine Zoonose und kann unbehandelt beim Menschen zum Tod führen. Rinder, Schafe, Schweine und Geflügel sind nicht empfänglich.

Inkubationszeit: drei Tage bis mehrere Monate

Als Basis für den Terrestrial Animal Code (OIE) wird die Infektionszeit von *B. mallei* bei Equiden als lebenslang angesehen und die Inkubationszeit auf sechs Monate festgelegt.

Labordiagnostischer Nachweis

- Erregernachweis (Isolierung und molekularbiologischer Nachweis)
- Antikörpernachweis (KBR, Immunoblot, ID Screen Glanders Double Antigen Multispecies ELISA (GLANDA ELISA))

Zusatzinformation

B. mallei-Infektionen sind serologisch nicht oder nur schwer von Infektionen mit Pseudomonaden, *B. pseudomallei* und Streptokokken abzugrenzen. Für die serologische Bestätigung steht ein Westernblot am Nationalen Referenzlabor zur Verfügung. Die Erregeranzucht und -identifizierung ist aus Nasensekret, Lungenauswurf, Hauteiter und *post mortem* aus veränderten Organen, insbesondere eitrigen Geschwüren und regionalen Lymphknoten, möglich. Außerdem kann der molekularbiologische Nachweis mittels PCR erfolgen. Positive KBR-Befunde bedürfen immer einer serologischen Abklärungsuntersuchung. Diese sollte mindestens 3-mal im Abstand von zwei bis drei Wochen negativ verlaufen, bevor eine Bestandssperre aufgehoben wird. Gezielte Tätigkeiten mit dem Erreger müssen in S3-Sicherheitslaboren durchgeführt werden.

Differenzialdiagnose

Melioidose, Pocken, Druse, Tuberkulose, *Lymphangitis epizootica*, *Lymphangitis ulcerosa*, Influenza, Rhinopneumonitis, Nocardiose, Botryomykose, Sporotrichose, parasitäre Lungenveränderungen.

Epidemiologischer Zusammenhang

In einigen Teilen Asiens und Südamerikas ist Rotz endemisch. Die Übertragung erfolgt direkt durch Kontakt mit infizierten Tieren über die Schleimhaut oder Hautläsionen und indirekt über kontaminiertes Futter, Tränke, Einstreu, Putzzeug oder Geschirr.

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.

Bemerkung: Es liegt in der Verantwortung der zuständigen Behörde, wie mit positiven, indirekten Nachweisen umgegangen wird. So kann auch ausgeschlossen werden, dass falsch-positive Befunde gemeldet werden. Ein Verdacht ist innerhalb Deutschlands über das TSN zu melden.

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

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“