

Amtliche Methode und Falldefinition

Beschälseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differenzialdiagnose	4
1.4 Diagnostische Indikation	4
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)	4
2. Untersuchungsmaterial	5
3. Untersuchungsgang	5
3.1 Nachweis spezifischer Antikörper	5
Falldefinition - Beschälseuche der Pferde	22

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Beschläseuche (Dourine) ist eine klassische Deckseuche. Sie wird durch die Infektion mit *Trypanosoma* (*T.*) *equiperdum* (Doflein, 1901) verursacht und befällt ausschließlich Einhufer. Im Gegensatz zu allen übrigen Trypanosomen wird der Erreger nicht durch Insekten übertragen, sondern ausschließlich beim Deckakt.

Das Subgenus Trypanozoon umfasst drei Subspezies *T. brucei* (*T. brucei brucei*, *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense*), *T. evansi* und *T. equiperdum*. *T. brucei*, *T. evansi* und *T. equiperdum* werden derzeit über die Zusammensetzung ihrer Kinetoplast-DNA (kDNA) klassifiziert: *T. brucei* besitzt eine vollständige intakte Maxicircle-kDNA, während diese bei *T. evansi* vollständig fehlt und bei *T. equiperdum* die Integrität der Maxicircle-kDNA je nach Stamm stark variieren kann; beide, *T. evansi* und *T. equiperdum* werden als dyskinetoplastisch bezeichnet.

Es wird davon ausgegangen, dass der Beschläseucheerreger in Afrika, Asien, Südamerika, aber auch in Süd- und Südosteuropa, Russland und Teilen des Nahen und Mittleren Ostens vorkommt. In Deutschland ist die Beschläseuche seit den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts nicht mehr präsent.

Inkubationszeit, Schweregrad und Dauer der Erkrankung sind sehr unterschiedlich. Die Inkubationszeit wird mit zwei bis 26 Wochen angegeben. Oft verläuft die Infektion nur subklinisch. Esel und Maultiere sind widerstandsfähiger als Pferde. Bei Eseln verläuft die Krankheit oft unbemerkt, während ihre Samen- und Vaginalsekrete infektiöse Trypanosomen enthalten.

Die Tenazität von *T. equiperdum* in der Umwelt außerhalb von Wirtstieren wird als sehr gering angesehen. Es wurde gezeigt, dass bereits eine fünfminütige Inkubation bei 50 °C in Zellkulturmedium ausreichend ist, um verschiedene Trypanosomen-Spezies sicher abzutöten. Präzise Daten zum Einfluss der Temperatur oder Austrocknung auf das Überleben liegen nicht vor. Eine thermische Desinfektion (60 °C Kerntemperatur, 15 min) wird für Tätigkeiten mit Trypanosomen in Laboratorien empfohlen (TRBA 100, Schutzmaßnahmen für Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien).

1.2 Klinische Symptomatik

Die Inkubationszeit wird mit zwei bis 26 Wochen angegeben. Die Beschläseuche nimmt in der Regel einen chronischen Verlauf mit hoher Variabilität der Manifestation und des Schweregrades der Symptome, der sich über Jahre erstrecken kann und letztlich meist zum Tode führt führen kann. Die klinischen Erscheinungen sind bei Hengst und Stute gleichermaßen im ersten Stadium durch Entzündung der äußeren Geschlechtsorgane mit Schwellungen, Rötungen, Flecken von Pigmentverlust in der Schleimhaut und schleimigem Ausfluss charakterisiert. Die Schwellungen an den Genitalien können sich über das Perineum bis zum Unterbauch bzw. Brustbereich fortsetzen. Im zweiten Stadium entwickelt sich ausgedehnte Urtikaria mit kreisrunden

Beschläseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

Schwellungen im Hals-, Schulter- und Brustbereich sowie der Kruppe, von denen nach Abheilung farblose Flecken (Talerflecken) zurückbleiben. Die dritte Phase ist durch Apathie, Schwäche, Fressunlust und zentralnervöse Symptome wie einseitige Paralyse des *N. facialis* (Lähmung der Lippen), Steifheit, Koordinationsstörungen, Lähmungen, insbesondere der hinteren Extremitäten, zunehmende Abmagerung und Anämie gekennzeichnet.

1.3 Differenzialdiagnose

Vergleichbare Symptome, oft nur im Schweregrad verschieden, können bei Infektion mit *Trypanosoma (T.) evansi*, dem Erreger der Surra **bei Kamelen**, auftreten. Eine Infektion mit diesem Erreger, der durch ein breites Wirtsspektrum charakterisiert ist und auch beim Pferd vorkommt, kann mit den bisher verfügbaren immundiagnostischen Methoden nicht von der Infektion mit *T. equiperdum* unterschieden werden. Einzelne ähnliche Krankheitserscheinungen treten auch bei der Deckdruse (Erreger: *Streptococcus equi*) und beim Bläschenausschlag (Koitales Exanthem, Erreger: Equine Herpes-Virus Typ III) auf.

1.4 Diagnostische Indikation

Klinisch, epidemiologisch oder anamnestisch begründeter Verdacht, **gemäß Entscheidung der EU-Kommission 90/426/EWG; 93/197/EWG.**

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Friedrich-Loeffler-Institut, Referenzlabor für Beschläseuche, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 038351 7-0
- Staatliche Veterinäruntersuchungsämter

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) in der jeweils aktuellen Fassung
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1301 vom 27. September 2018 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) 2018/659 über die Bestimmungen für den Eingang lebender Equiden sowie von Sperma, Eizellen und Embryonen von Equiden in die Union
- **Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 vom 9. März 2016 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union (EU) 2020/688 vom 17. Dezember 2019**
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz, TierGesG) in der derzeit gültigen Fassung

2. Untersuchungsmaterial

Der Nachweis des Erregers ist ausgesprochen schwierig und gelingt nur sehr selten während der akuten Phase der Erkrankung in Vaginal- oder Präputialspülproben, in Exudat- oder Gewebeproben noch seltener im Blut. Somit zielen die diagnostischen Verfahren nicht auf den Erregernachweis, sondern auf den Nachweis von spezifischen Antikörpern im Blutserum ab. Nach der Klassifizierung serologischer Verfahren durch die **OIE WOAH** gilt hier die Komplementbindungsreaktion (KBR) nach wie vor als Methode der Wahl. Auch der "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), der indirekte Fluoreszenz - Antikörpertest (IFAT) sowie der Immunochromatographische Test (ICT) sind im "Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals" der **OIE-WOAH** als alternative Verfahren aufgeführt. Ein Erregernachweis mittels PCR in Präputial- oder Vaginalspülproben ist nur gelegentlich und nur in frühen Krankheitsstadien erfolgreich. Bei einer Infektion mit *T. evansi* kann ein Erregernachweis im Blut auch im chronischen Stadium gelingen. Einsendungen sollten mit anamnestischen Angaben erfolgen; eine Vorlage für einen Einsendebogen befindet sich auf der Homepage des Friedrich-Loeffler-Instituts: <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-epidemiologie-ife/referenzlabore/nrl-fuer-beschaelseuche/>.

3. Untersuchungsgang

Da die Beschläseuche in Deutschland und den meisten Ländern der nördlichen Hemisphäre getilgt ist, beschränkt sich die Beschreibung diagnostischer Methoden hier auf den Nachweis von spezifischen Antikörpern im Blutserum mittels Komplementbindungsreaktion (**OIE-WOAH**).

3.1 Nachweis spezifischer Antikörper

3.1.1 Komplementbindungsreaktion (KBR)

3.1.1.1 Allgemeines

Die KBR ermöglicht einen qualitativen und quantitativen Nachweis von komplementbindenden Antikörpern gegen *T. equiperdum* im Blutserum von Pferd und Esel sowie Kreuzungstieren aus Pferd und Esel.

Die KBR kann bei 37 °C (Wärmebindung) oder bei 4 °C (Kältebindung) durchgeführt werden. Das Nationale Referenzlabor (NRL) fordert nachdrücklich dazu auf, sich an den Vorgaben der **OIE-WOAH** zu orientieren (Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, aktuell gültige Fassung) und den Test bei 37 °C (Wärmebindung) durchzuführen.

Als Verdünnungspuffer für die KBR ist HEPES-Puffer (kommerziell erhältlich oder selbst hergestellt) zu nutzen, da Veronalpuffer nicht mehr verwendet werden sollten.

Es sollten möglichst viele kommerziell erhältliche Reagenzien genutzt werden, um ein größtmögliches Maß an Standardisierung zu erzielen. Die Verwendung von durch den Hersteller aufeinander abgestimmten Reagenzien ist dabei besonders zu empfehlen, da sich dann viele Validierungsschritte im Labor erübrigen.

Beschläseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

Der Verdünnungspuffer ist vor Beginn der Untersuchung im Wasserbad auf eine Temperatur von ca. 37 °C zu erwärmen.

3.1.1.2 Grundlagen

- OIE-WOAH Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Paris, in der jeweils aktuellen Fassung)
- "Standard Operating Procedure" des EU Referenzlabors für Pferdekrankheiten (<https://sitesv2.anses.fr/en/system/files/Dourine%20SOP%20V1.1.pdf>)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1301 vom 27. September 2018

3.1.1.3 Materialien/Geräte

3.1.1.3.1 Geräte

- Zentrifuge mit Mikrotiterplattenrotor (optional)
- Brutschrank/Brutraum (37 ± 1 °C), eventuell mit Sandbad
- Schüttelwasserbad (37 ± 1 °C)
- Wasserbad (58 ± 1 °C und 62 ± 1 °C)
- Kühltank (+2 bis +8 °C)
- Gefrierschrank oder Truhe (-18 bis -24 °C)
- Schüttelgerät für Mikrotiterplatten
- Einkanal-Kolbenhubpipetten (1-10 µl, 10 - 100 µl, 20-200 µl, 100 - 1000 µl, 5 ml)
- Mehrkanalkolbenhubpipette (20 - 100 µl)
- Ablesespiegel für Mikrotiterplatten (optional)

3.1.1.3.2 Gebrauchsmaterialien

- Reagenz-/Zentrifugenröhrchen (Einweg, 15 ml)
- Erlenmeyerkolben, Becherglas oder Schottflasche (100 ml)
- Mikrotiterplatten mit Deckel (U-Form, 96 Kavitäten)
- Pipettenspitzen (1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl, 5 ml)
- Reagenzglasständer
- Schwimmständer
- feuchte Kammer für Mikrotiterplatten
- Reagenzgefäße (Plastik; 1,5 oder 5,0 ml)

3.1.1.3.3 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Reagenzien, Herkunft	Lagerung
Beschläseuche-Antigen, mit definierter Konzentration (siehe Etikett), lyophilisiert, NRL	Lagerung lyophilisiert bei mind. -18 bis -24 °C
Beschläseuche-Kontrollserum, positiv, mit definiertem Titer (siehe Etikett), lyophilisiert, NRL	Lagerung lyophilisiert bei +2 bis +8 °C oder rekonstituiert und portioniert bei -18 bis -24 °C
Beschläseuche-Kontrollserum, negativ, lyophilisiert, NRL	Lagerung lyophilisiert bei +2 bis +8 °C oder rekonstituiert und portioniert bei -18 bis -24 °C
Ambozeptor (Hämolsin); z. B. ID.vet, http://www.id-vet.com	Lagerung im Kühlschrank (+2 bis +8 °C)
Hammel-Erythrozyten (z. B. Boehringer-Ingelheim (http://www.boehringer-ingelheim.de ; 1%ige Suspension, Verwendbarkeit: 4 Wochen)	Lagerung im Kühlschrank (+2 bis +8 °C)
KBR- oder CFTB-Puffer (z. B. ID.vet, http://www.id-vet.com ; HEPES-Puffer, entsprechend der Herstellerangabe zu lösen).	Lagerung im Kühlschrank (+2 bis +8 °C)
Komplement; z. B. ID.vet, http://www.id-vet.com	Lagerung lyophilisiert bei +2 bis +8 °C oder rekonstituiert und portioniert bei -18 bis -24 °C
Steriles Aqua bidest.	Frisch, gefiltert mittels 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter

3.1.1.4 KBR-Vorversuch (Antigen- und Komplementtitration)

Der KBR-Vorversuch dient der Vorbereitung des Hauptversuchs, um die geeignete Antigenkonzentration zu bestimmen (oder zu verifizieren) und die aktuelle Komplementaktivität festzustellen. Die Ermittlung der Antigengebrauchsverdünnung (Antigentitration) wird bei der Herstellung jeder Antigencharge durch das Nationale Referenzlabor durchgeführt. Sie kann, muss aber nicht, verifiziert werden. Das im Folgenden beschriebene Protokoll gilt für den Fall, dass von kommerziellen Anbietern aufeinander abgestimmte Reagenzien für die KBR verwendet werden.

3.1.1.4.1 Herstellung der Antigenstammlösung

Lyophilisiertes Antigen wird mit sterilem *Aqua bidest.* zu dem auf dem Etikett angegebenen Volumen gelöst (Stammlösung). Gelöstes Antigen wird mit KBR-Puffer zur Gebrauchsverdünnung (siehe Etikett der Ampulle) verdünnt. Es ist im Kühlschrank zu lagern und am gleichen Tag zu verwenden; gelöste Reste sind zu verworfen.

3.1.1.4.2 Vorbereitung der Probe- und Kontrollseren

- Verunreinigte und hämolytische Seren sind zur Untersuchung nicht geeignet.

Beschläuseche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

- Lyophilisierte Seren sind mit sterilem *Aqua bidest.* entsprechend der Anweisungen auf dem Etikett zu rekonstituieren.
- Vor der Untersuchung sind alle Serumproben einschließlich der Kontrollseren im Wasserbad zu inaktivieren (siehe folgende Tabelle).
- 1 : 5 verdünntes Serum wird in Reaktionsgefäßen (1,5 - 5,0 ml) inaktiviert. Bereits zu einem früheren Zeitpunkt inaktivierte und bei -18 bis -24 °C gelagerte Serumproben werden nochmals für 10 min bei der entsprechenden Temperatur inaktiviert. Für Vor- und Hauptversuch werden 2,0 ml verdünntes Serum benötigt (Kontrollseren). Bei Seren, die nur im Hauptversuch untersucht werden (Probeserum), reichen 200 µl verdünntes Serum.

Serumverdünnung (in KBR-Puffer)	Tierart	Inaktivierungstemperatur (°C)	Inaktivierungszeit (min)
1 : 5	Pferd	58	30
1 : 5	Maultier, Maulesel, Esel	62	30

3.1.1.4.3 Hämolytisches System

3.1.1.4.3.1 Erythrozyten-Suspension

Das Hämolytische System (HS) macht die Aktivität des Komplements in Anwesenheit eines Antigen-Antikörper-Komplexes sichtbar (Indikatorsystem). Das HS wird für jeden Test frisch angesetzt. Sind die kommerziell erhältliche Erythrozytensuspension und die Ambozeptorlösung aufeinander abgestimmt, so ist die eigene Ermittlung der einzusetzenden Ambozeptorkonzentration nicht erforderlich. Das Nationale Referenzlabor empfiehlt die Verwendung einer 1%igen Erythrozytensuspension.

3.1.1.4.3.2 Herstellung des HS für die KBR

- 1%ige Erythrozytensuspension (E); sedimentierte Erythrozyten vorsichtig aufschütteln
- Ambozeptor-Gebrauchslösung (A); nach Herstellerangaben (z.B. ID.vet) vorbereitet (z. B. 1 : 1000 in KBR-Puffer)
- EA-Suspension besteht zu gleichen Teilen aus E und A; nach Herstellerangaben im Becherglas mischen, 30 min bei 37 ± 1 °C abgedeckt im Schüttelwasserbad inkubieren; sanft bewegen, damit sich der Erythrozyten-Antikörper-Komplex bilden kann. Eventuell während der Inkubation ein- bis zweimal leicht schwenken, da die Erythrozyten leicht sedimentieren.
- Das HS darf am Ende der Inkubation keine Anzeichen von Hämolyse aufweisen.

3.1.1.4.4 Durchführung des Vorversuchs und Vorbereitung des Hauptversuchs

3.1.1.4.4.1 Allgemeines

Das lyophilisierte Komplement wird mit Aufnahmepuffer 17 (ID.vet) nach Herstellerangaben gelöst. Bei +2 bis +8 °C ist die Komplementstammlösung begrenzt haltbar (z. B. zwei Wochen; Herstellerangaben beachten). Die Komplementstammlösung kann aliquotiert (100 µl pro Portion) bei mindestens ≤ -16 °C eingefroren werden.

Die Komplementgebrauchslösung wird durch Verdünnung der Stammlösung vor Gebrauch frisch hergestellt. Die Komplementaktivität der Gebrauchslösung muss bei jedem Versuch neu ermittelt werden - auch bei Versuchen im Abstand von ca. 24 Stunden.

Da die Komplementaktivität im Laufe der Zeit abnimmt, die Erythrozytenkonzentration von Charge zu Charge geringe Unterschiede aufweist und das Antigen die Komplementaktivität beeinflussen kann, sind bei jedem Vorversuch zusätzlich zur Komplementgebrauchsverdünnung, die vom Hersteller empfohlen wird, zwei weitere Verdünnungen knapp unterhalb der vom Hersteller empfohlenen Konzentration anzusetzen.

Beispiel:

vom Hersteller empfohlene Verdünnung	1 : 55
zwei weitere Verdünnungen	1 : 50, 1 : 45

3.1.1.4.4.2 Durchführung der Antigen- und der Komplementtitration

3.1.1.4.4.2.1 Vorbereitung der Reagenzien

1. Feuchte Kammer offen in den Brutschrank stellen (Temperatenausgleich)
2. Mindestens 10 ml KBR-Puffer im Wasserbad auf 37 ± 1 °C temperieren (mind. 10 min)
3. Herstellung von Positivkontrollserum 1 : 5; 2000 µl (für Vorversuch und Hauptversuch)
4. Herstellung von Negativkontrollserum 1 : 5; 2000 µl (für Vorversuch und Hauptversuch)
5. Herstellung von Probeserum 1 : 5; 200 µl (für Hauptversuch)
6. Herstellung einer Verdünnungsreihe der Antigengebrauchslösung in KBR-Puffer: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 60, 1 : 80, 1 : 100, 1 : 120 sowie die vom Nationalen Referenzlabor empfohlene Verdünnung (siehe Etikett); 400 µl Antigenverdünnung je Verdünnungsstufe.
7. Herstellung der drei Komplementgebrauchslösungen in KBR-Puffer

Komplementverdünnung 1 : 45	4400 µl + 100 µl Komplement	für Platte A
1 : 50	4900 µl + 100 µl Komplement	für Platte B
1 : 55	5400 µl + 100 µl Komplement	für Platte C

Beschläseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

3.1.1.4.4.2.2 Belegung der Mikrotiterplatte

Beispiel für die Plattenbelegung im KBR-Vorversuch; für die Komplementgebrauchslösungen (z. B. 1 : 45, 1 : 50 und 1 : 55) wird je eine Platte verwendet:

											Komplementtitration:												
											SK:	PKS:	PKS:	NKS:	NKS:	AGK:							
											1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
AG-Titer:																							
1:10	PKS:	A									leer	leer								KomplK:			
1:20	PKS:	B									leer	leer									KomplK:		
1:40	NKS:	C									leer	leer	leer	leer	leer	leer							
1:60	NKS:	D									leer	leer	leer	leer	leer	leer							
1:80		E	leer								leer	leer	leer	leer	leer	leer							
1:100		F	leer								leer	leer	leer	leer	leer	leer							
1:120		G	leer								leer	leer	leer	leer	leer	leer							
Verd. laut Etikett		H	leer								leer	leer	leer	leer	leer	leer							
																						Häk:	Häk:

Abkürzungen: AG: Antigen; Verd. laut Etikett: auf dem Antigenlyophilisat angegebene Verbrauchsverdünnung; SK: Serumkontrolle; PKS: Positivkontrollserum; NKS: Negativkontrollserum; AGK: Antigenkontrolle; Komplementtitration: Komplementtitration (aus der jeweiligen Gebrauchslösung); KomplK: Komplementkontrolle; Häk: Kontrolle des HS

- Spalte 1 A, B Serumkontrolle PKS (Serum 1 : 5)
- Spalte 1 C, D Serumkontrolle NKS (Serum 1 : 5)
- Spalten 2 + 3 A - H Antigenverdünnungsstufen + PKS 1 : 5; Doppelbestimmung
- Spalten 3 + 5 A - H Antigenverdünnungsstufen + NKS 1 : 5; Doppelbestimmung
- Spalte 6 A - H Antigenkontrolle (Antigenverdünnungsstufen)
- Reihe A, B 9 - 12 Komplementvorversuch
- Reihe H 11, 12 Kontrolle HS

Beschlässeuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

3.1.1.4.4.2.3 Ablauf des KBR-Vorversuchs und Bewertung der Ergebnisse

Beschriftung von drei Mikrotiterplatten; Belegung siehe Abbildung, jeweils alle drei Platten gleichartig befüllen, außer beim Komplement

Platte A für Komplementgebrauchsverdünnung 1 : 45

Platte B für Komplementgebrauchsverdünnung 1 : 50

Platte C für Komplementgebrauchsverdünnung 1 : 55

1. KBR-Puffervorlage, 25 µl

SK

A1 - D1

AGK

A6 - H6

Komplementverdünnungen (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8)

A/B10 - 12

KBR-Puffervorlage, 75 µl

Häk

H11, 12

2. Antigenzugabe, 25 µl, jeweilige Antigenverdünnung gemäß Plattenbeschriftung

PKS (Doppelbestimmung)

A2,3 - H2,3

NKS (Doppelbestimmung)

A4,5 - H4,5

AGK

A6 - H6

3. Kontrollserumzugabe (Verdünnung 1 : 5), 25 µl (Von H nach A pipettieren!)

NKS (Doppelbestimmung)

H4,5 - A4,5

SK (NKS)

C/D1

PKS (Doppelbestimmung)

H2,3 - A2,3

SK (PKS)

A/B1

4. Komplementzugabe, 25 µl

Jeweilige Komplementverbrauchsverdünnung

zunächst in Verdünnungsstufen 1 : 1 und 1 : 2

A/B9 - A/B10

dann 25 µl von Verdünnungsstufe 1 : 2 zu 1 : 4 zu 1 : 8 überpipettieren

A/B 11, 12

SK

A1 - D1

AGK

A6 - H6

NSK (Doppelbestimmung)

A4,5 - H4,5

PKS (Doppelbestimmung)

A2,3 - H2,3

HS

H11,12

5. Antigenzugabe zu Komplementtitration, 25 µl

Antigenkonzentration gemäß Etikett des Antigenfläschchens

A/B9 - A/B12, H2 - 6

Beschälseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

6. Pufferzugabe zu Komplementtitration, 25 µl A/B9 - A/B12
7. Inkubation 65 min in feuchter Kammer bei 37 ± 1 °C
8. Herstellung des HS (ca. 25 min nach Beginn der Inkubation in Pkt. 7)
4995 µl Puffer (ID.vet) + 5000 µl Erythrozyten (Boehringer-Ingelheim) + 5 µl Ambozeptor (ID.vet) in ein Becherglas
(breite Fläche, geringe Höhe der Flüssigkeitssäule), schwenken, abdecken,
30 min Schüttelwasserbad 37 ± 1 °C, sanft bewegen
9. Zugabe des HS, 50 µl
- | | |
|-----------------------------|--------------|
| SK | A1 - D1 |
| AGK | A6 - H6 |
| NKS (Doppelbestimmung) | A4,5 - H4,5 |
| PKS (Doppelbestimmung) | A2,3 - H 2,3 |
| Komplementtitration | A/B9 - A/B12 |
| Häk | H11,12 |
| Platte vorsichtig schütteln | |
10. Inkubation
Feuchte Kammer, 30 min, 37 ± 1 °C
11. Zentrifugation
5 min, ca. 700 x g

3.1.1.4.2.4 Bewertung des KBR-Vorversuchs

Bewertung des Vorversuchs - Komplementgebrauchsverdünnung:

Die geringste Komplementkonzentration (höchste Verdünnung), die in den Kavitäten 9 und 10 der Reihen A und B (Komplementgebrauchsverdünnung 1 : 1 und 1 : 2) eine vollständige Hämolyse herbeiführt, entspricht zwei Komplementeinheiten. Im Hauptversuch werden gemäß OIE-Empfehlung zwei Komplementeinheiten verwendet.

Bewertung des Vorversuchs - Antigentitration:

Das Ablesen der Reaktion je Verdünnungsstufe erfolgt nach dem Grad der Hämolyse und der Größe des Erythrozytensediments (Knopfbildung).

Beschläuseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

Hämolyse	Beschreibung	Interpretation
100 % Hämolyse = 0 % Sediment	Kein oder maximal winziges, schwach rötliches Erythrozytensediment mit deutlichem rötlichen KBR-Puffer (mögliche Ursachen für das Auftreten eines winzigen Erythrozytensediments: Ungenauigkeit beim Pipettieren, ungenauer Komplementvorversuch, fehlendes Schütteln der Platte)	Negativ
75 % Hämolyse = 25 % Sediment	Erythrozytensediment klein mit deutlichem rötlichen KBR-Puffer	Fraglich (+)
50 % Hämolyse = 50 % Sediment	Erythrozytensediment etwa halbe Größe mit rötlichem KBR-Puffer	Positiv (++)
25 % Hämolyse = 75 % Sediment	Großes Erythrozytensediment mit leicht rötlichem KBR-Puffer	Positiv (+++)
<25 % Hämolyse = 100 % Sediment	Großes Erythrozytensediment mit nahezu wasserklarem KBR-Puffer	Positiv (++++)

- Die geringste Antigenkonzentration, bei der mit dem PKS (1 : 5) eine positive +++-Reaktion erreicht wird, entspricht einer Antigeneinheit. Im Hauptversuch sollen gemäß OIE Empfehlung zwei Antigeneinheiten (also die doppelte Konzentration) verwendet werden.
- Wenn mit den verwendeten Verdünnungsstufen der Übergang von einer +++-Reaktion zu einer +++-Reaktion nicht erreicht wird, muss eine erneute Antigentitration mit höheren Verdünnungsstufen durchgeführt werden.
- Mit dem NKS soll bei allen Antigenkonzentrationen eine vollständige Hämolyse erreicht werden.
- Für jede Antigencharge wird die Antigentitration im Nationalen Referenzlabor durchgeführt und die empfohlene Gebrauchsverdünnung auf dem Etikett des Antigenfläschchens vermerkt. Bei Verwendung des vom Nationalen Referenzlabor abgegebenen Antigens kann daher auf die Antigentitration verzichtet werden; optional kann die empfohlene Antigenkonzentration verifiziert werden

3.1.1.5 KBR-Hauptversuch (Titration des Probeserums)

3.1.1.5.1 Allgemeines

Die Pufferlösung ist vor Verwendung auf ca. 37 ± 1 °C zu erwärmen. Das Komplement ist auf Raumtemperatur zu erwärmen.

Für den KBR-Hauptversuch wird diejenige Komplementverdünnung aus dem Vorversuch verwendet, die sowohl unverdünnt als auch 1 : 2 verdünnt eine vollständige oder nahezu vollständige Hämolyse des EA-Komplexes herbeiführt, also zwei Komplementeinheiten enthält (siehe Bewertung des Vorversuchs). Zur Bestätigung wird auch auf der Platte des Hauptversuchs eine Komplementkontrollreihe (wie beim Vorversuch) mitgeführt.

Beschläseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

Für die Bestimmung des Serumtiters werden das PKS, das NKS und die Probeseren mit einer Verdünnung von 1 : 5 als geringster Verdünnung mit anschließender Verdünnungsreihe in Zweierschritten untersucht (1 : 5 - 1 : 5120).

Die Gebrauchskonzentration des Antigens befindet sich auf dem Etikett des Antigenfläschchens oder wurde im Vorversuch ermittelt.

Beispielhafte Plattenbelegung für den KBR-Hauptversuch:

		Serumtitration:												
		SK:	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
PKS:	A													
PKS:	B													
NKS:	C													
NKS:	D													
Proben-serum:	E													
Proben-serum:	F													
AGK:	G			leer	leer	leer	leer	leer	leer					KomplK:
Häk:	H			leer	leer	leer	leer	leer	leer					KomplK:
										1:1 ↑	1:2 ↑	1:4 ↑	1:8 ↑	
										Titration, Komplementgebrauchs- verdünnung				

Abkürzungen: SK: Serumkontrolle; PKS: Positivkontrollserum; NKS: Negativkontrollserum; AGK: Antigenkontrolle; Häk; Kontrolle des HS; KomplK: Komplementkontrolle; Titration, Komplementgebrauchsverdünnung: Komplementtitration (aus der im Vorversuch ermittelten Gebrauchslösung)

3.1.1.5.2 Durchführung

1. KBR-Puffervorlage, 25 µl

SK

A1 - F1

PKS-Verdünnungsreihe

A3/B3 - A12/B12

NKS-Verdünnungsreihe

C3/D3 - C12/D12

Probeserum-Verdünnungsreihe

E3/F3 - E12/F12

AGK

G1, 2

Komplementtitration (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8)

G/H10 -12

KBR-Puffervorlage, 75 µl

Häk

H1, 2

Beschläuseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

2. Serumzugabe (Verdünnung 1 : 5), 25 µl

SK (NKS)	C1/D1
NKS (Doppelbestimmung)	C2,3/D2,3
SK (PKS)	A1/B1
PKS (Doppelbestimmung)	A2,3 /B2,3
SK (P1)	E1/F1
Probserum (Doppelbestimmung)	E2,3/ F2,3

3. Titration der Seren

Je 25 µl von Verd.-Stufe 1 : 10 (Spalte 3 A - F) bis Verd.-Stufe 1 : 5120 (Spalte 12 A - F) überpipettieren

4. Antigenzugabe, 25 µl, jeweilige Antigenverdünnung gemäß Plattenbeschriftung

NKS (Doppelbestimmung)	C12/D12 - C2/D2
Probserum (Doppelbestimmung)	E12/F12 - E2/F2
PKS (Doppelbestimmung)	A12/B12 - A2/B2
AGK	G1,2

Hinweis: Bei dieser Reihenfolge wird die Gefahr der Kontamination von NKS und Probserum mit PKS minimiert.

5. Komplementzugabe (Konzentration entsprechend den Ergebnissen des Vorversuchs), 25 µl

SK, PKS, NKS, Probserum	Spalten 12 - 2A - F
AGK	G1,2

6. Komplementzugabe in Komplementtitration, 25 µl

zunächst in Verdünnungsstufen 1 : 1 und 1 : 2	G9,10/H9,10
dann je 25 µl von Stufe 1 : 2 über 1 : 4 nach 1 : 8 überpipettieren	G11,12/H11,12

7. Antigenzugabe in Komplementtitration, 25 µl

G9/H9 - G12/H12

8. KBR-Pufferzugabe zu Komplementtitration, 25 µl

Platte kurz vorsichtig schütteln

G9/H9 - G12/H12

9. Inkubation 65 min in feuchter Kammer bei 37 ± 1 °C

10. Herstellung des HS (ca. 25 min nach Beginn der Inkubation in Pkt. 9)

2497,5 µl Puffer (ID.vet) + 2500 µl Erythrozyten (Boehringer-Ingelheim) + 2,5 µl Ambozeptor (ID.vet) in ein Becherglas pipettieren
(breite Fläche, geringe Höhe der Flüssigkeitssäule), schwenken, abdecken,
30 min Schüttelwasserbad 37 ± 1 °C, sanft bewegen

Beschläseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

11. Zugabe des HS, 50 µl

PKS, NKS, Probeserum, SK

AGK

HS

Komplementtitration

Platte schütteln

Spalten 12 - 1 A - F

G1,2

H1,2

G12/H12 - G9/H 9

12. Inkubation

Feuchte Kammer, 30 min, 37 ± 1 °C

13. Zentrifugation

5 min, ca. 700 x g

Alternativ: Platte mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur

oder über Nacht bei 4 °C stehen lassen

3.1.1.5.3 Interpretation der Ergebnisse

Das Ablesen der Reaktion je Verdünnungsstufe erfolgt nach dem Grad der Hämolyse und der Größe des Erythrozytensediments (Knopfbildung).

Hämolyse	Beschreibung	Interpretation
100 % Hämolyse = 0 % Sediment	Kein oder maximal winziges, schwach rötliches Erythrozytensediment mit deutlichem rötlichen KBR-Puffer (mögliche Ursachen für das Auftreten eines winzigen Erythrozytensediments: Ungenauigkeit beim Pipettieren, ungenauer Komplementvorversuch, fehlendes Schütteln der Platte)	Negativ
75 % Hämolyse = 25 % Sediment	Erythrozytensediment klein mit deutlichem rötlichen KBR-Puffer	Fraglich (+)
50 % Hämolyse = 50 % Sediment	Erythrozytensediment etwa halbe Größe mit rötlichem KBR-Puffer	Positiv (++)
25 % Hämolyse = 75 % Sediment	Großes Erythrozytensediment mit leicht rötlichem KBR-Puffer	Positiv (+++)
<25 % Hämolyse = 100 % Sediment	Großes Erythrozytensediment mit nahezu wasserklarem KBR-Puffer	Positiv (++++)

Alle Kontrollen müssen das erwartete Resultat zeigen, andernfalls ist der Test nicht valide.

- **Positives Kontrollserum:**
In Abhängigkeit vom Antikörpergehalt kommt es zur Sedimentbildung mit und ohne partieller Hämolyse. Der Titer der Positivkontrolle sollte höchstens eine Titerstufe vom erwarteten Wert (siehe Etikett) abweichen.
- **Negatives Kontrollserum:**
100 % Hämolyse, es darf kein oder nur ein winziges Erythrozytensediment entstehen.
- **Probeserum:**
Wird bei einer Serumprobe (1 : 5) ein fragliches (+) oder positives (++) KBR-Ergebnis erzielt, so wird die Probe erneut untersucht, um das Ergebnis abzusichern.
- **Serumkontrolle (zur Ermittlung antikomplementärer Eigenschaften des Serums):**
Im Regelfall ist bei der Serumkontrolle (1 : 5) z. B. des Probeserums 100 % Hämolyse zu erwarten. Ist dies nicht der Fall, so ist eine Verdünnungsreihe mit diesem Serum durchzuführen (SK, ohne Antigen). In der Regel verschwindet die unerwünschte Reaktion schon bei einer Serumverdünnung von 1 : 10. Sofern die positive Reaktion bei der Serumkontrolle (SK) und dem positiven KBR-Titer des Probeserums (P) um mindestens zwei Titerstufen differiert, z. B. SK des Probeserums 1 : 5, KBR-Titer des Probeserums 1 : 20, so ist die KBR dennoch als auswertbar zu betrachten.

3.1.1.6 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht dokumentiert mit eindeutigen Angaben das Ergebnis für die untersuchte Serumprobe sowie die angewandte Untersuchungsmethode (Antikörper nachgewiesen, nicht nachgewiesen).

3.1.1.7 Referenz für die Auswertung

Gemäß OIE Manual 2013 und Durchführungsverordnung (EU) 2018/1301 vom 27. September 2018 gelten Titer ab 1 : 5 ++ (Wärmebindung) als positiv.

3.1.1.8 Erforderliche zusätzliche Schritte bei nicht aufeinander abgestimmten KBR-Reagenzien

3.1.1.8.1 Vorgehen mit selbst gewonnenen Erythrozyten

Es ist darauf zu achten, dass keine Blutgerinnung eintritt. Das mit Alsever's Lösung (Gerinnungshemmung) versetzte Hammelblut (Anhang 3.1.1.9.1.) wird 3- bis 5-mal in Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 1000 x g, 10 min, 10 °C) bis die überstehende Flüssigkeit wasserklar ist. Der Überstand wird jeweils verworfen.

Das gewaschene Erythrozytensediment wird vorsichtig aufgeschüttelt (kein Vortex), so dass eine gleichmäßig dichte Suspension entsteht, die pipettierbar ist. Mit KBR-Puffer wird eine 1%ige Suspension hergestellt. Die Konzentration sollte photometrisch kontrolliert werden (540 nm).

Da für käuflich erworbene Erythrozyten bei Lagerung im Kühlschrank eine Haltbarkeit von maximal vier Wochen angegeben wird, sollten selbst gewonnene Erythrozyten ebenfalls höchstens vier Wochen genutzt werden.

Beschlässeuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

3.1.1.8.2 Ermittlung der benötigten Ambozeptor-(Hämolyisin-)Konzentration

- 1 x pro Charge durchzuführen
- Durchführung in der Mikrotiterplatte
- Doppelbestimmung
- Erste Verdünnungsstufe (Vol. 500 µl) in separatem Reaktionsgefäß ansetzen

3.1.1.8.2.1 Ansatz geometrischer Verdünnungsreihen des Ambozeptors

Beispiel:

Kavität	1	2	3	4	5	6	7
Reihe A	1 : 500	1 000	2 000	4 000	8 000	16 000	32 000
Reihe B	1 : 750	1 500	3 000	6 000	12 000	24 000	48 000

Ausgangsverdünnung des Ambozeptors 1 : 100 (z. B. 20 µl Ambozeptor + 1980 µl KBR-Puffer) = 2 ml

3.1.1.8.2.2 Durchführung der Ambozeptorauswertung

Ansatzschema der Ambozeptorauswertung

Gesamtvolumen: 100 µl pro Kavität (Doppelbestimmung)

Auswertung: Es ist die höchste Verdünnung des Ambozeptors zu bestimmen, mit der eine vollständige Hämolyse erreicht wird.

Kavität	KBR-Puffer	Ambozeptor (I)	Ambozeptor (II)	Erythrozyten-Suspension	Komplement 1 : 20
	(µl)	(25 µl)	(25 µl)	(µl)	(µl)
1	25	1 : 500	1 : 750	25	25
2	25	1 : 1 000	1 : 1 500	25	25
3	25	1 : 2 000	1 : 3 000	25	25
4	25	1 : 4 000	1 : 6 000	25	25
5	25	1 : 8 000	1 : 12 000	25	25
6	25	1 : 16 000	1 : 24 000	25	25
7	25	1 : 32 000	1 : 48 000	25	25

- Erythrozytenkontrolle: 25 µl Erythrozytensuspension (1 %) + 75 µl Puffer
- Komplementkontrolle: 25 µl Erythrozytensuspension (1 %) + 25 µl Komplement 1 : 20 + 50 µl KBR-Puffer
- Ambozeptorkontrolle: 25 µl Erythrozytensuspension (1 %) + 25 µl Ambozeptor 1 : 500 + 50 µl KBR-Puffer

3.1.1.8.2.3 Herstellung des Hämolytischen Systems (HS) für die KBR

- Erythrozyten-Ambozeptor-Mix nach eigenen Vorversuchen herstellen (Schottflasche)
- Schwenken
- 30 min bei $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ im Schüttelwasserbad inkubieren, damit sich der Erythrozyten-Antikörper-Komplex bilden kann

3.1.1.8.3 Komplement

Als Komplementquelle kann aus dem Blut von Meerschweinchen gewonnenes Plasma dienen (siehe Anhang 3.1.1.9.3.). Es ist portioniert (z. B. in Portionen von 100 μl) bei $-21 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ zu lagern.

Da bei der KBR zwei Komplementeinheiten verwendet werden sollen, muss durch Verdünnung des Komplements in KBR-Puffer oder HEPES-Puffer die erforderliche Verdünnung ausgetestet werden.

3.1.1.8.3.1 Ermittlung der benötigten Komplementkonzentration

- 25 μl der Komplementverdünnungen 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 30, 1 : 40, 1 : 50
- 25 μl Antigen (Gebrauchsverdünnung auf dem Etikett der Antigenfläschchen ausgewiesen)
- 50 ml HS (Gebrauchsverdünnung nach eigenen Vorversuchen herstellen)
- 25 μl KBR-Puffer (ersetzt das Serum)

3.1.1.8.3.2 Ansatz der Verdünnungsreihen des Komplements

Beispiel:

		Komplementverdünnungen							
Endkonzentration (%)		0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Komplementvorverdünnung, 1 : 10 in KBR-Puffer	(μl)	5	10	15	20	25	30	35	40
KBR-Puffer	(μl)	95	90	85	80	75	70	65	60

Beschlässeuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

3.1.1.8.3.3 Durchführung der Komplementauswertung

Kavität	Komplementverdünnung, je 25 µl der entsprechenden Endkonzentration, %	Antigengebrauchslösung µl	KBR-Puffer µl	Hämolytisches System µl
1	0,5	25	25	50
2	1	25	25	50
3	1,5	25	25	50
4	2	25	25	50
5	2,5	25	25	50
6	3,0	25	25	50
7	3,5	25	25	50
8	4,0	25	25	50

Es wird die geringste Komplementkonzentration bestimmt, die eine vollständige Hämolyse bewirkt. Diese Komplementkonzentration wird als eine Komplementeinheit definiert. Nach Empfehlung der OIE ist die KBR mit zwei Komplementeinheiten, also der doppelten Konzentration, durchzuführen.

Beispiel: Vollständige Hämolyse 2,0 %

Gebrauchskonzentration 4,0 %

3.1.1.9 Anhang

3.1.1.9.1 Alsever's Lösung zur Konservierung von Hammelbluterythrozyten

- Dextrose (Glucose) 18,66 g
- Natriumchlorid 4,18 g
- Natriumcitrat 8,00 g
- Aqua bidest. ad 1000,00 ml
- Lösen bei 100 °C im Dampftopf für 20 min

3.1.1.9.2 Hammelblut („sheep red blood cells“, SRBC)

Das Blut wird vom Schaf unter sterilen Bedingungen durch Punktion der *Vena jugularis* entnommen und unter leichtem Schütteln zu gleichen Teilen mit Alsever's Lösung in einem sterilen Gefäß (im geschlossenen System) aufgefangen. Ein Zusatz von Penicillin (200 000 IE/l) kann die Haltbarkeit erhöhen.

Lagerung bei Kühlschranktemperatur (+2 bis +8 °C).

3.1.1.9.3 Komplement

Das Komplement kann als Mischplasma (also aus Citrat-Blut) von gesunden Meerschweinchen, die vor dem Bluten 24 Stunden nicht gefüttert wurden, durch Kardialpunktion unter Narkose gewonnen werden. Nach

Beschlässeuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

Zentrifugation des Bluts bei ca. 700 x g für 10 min wird der Überstand (Citrat-Plasma) gewonnen. Dieser kann portioniert bei -18 bis -24 °C gelagert werden.

Witte-Lösung (Kalium-Borlösung) zur Konservierung von Meerschweinchenplasma:

Kaliumsulfat 10,0 g

Borsäure 4,0 g

Aqua bidest. ad 100,0 ml

1 h bei 100 °C im Dampftopf lösen

Plasma und Konservierungslösung werden zu gleichen Teilen gemischt. Der Verdünnungsfaktor des Plasmas muss beim Ansatz (Komplementtitration; 3.1.1.8.3.) berücksichtigt werden. Haltbarkeit bei geringem Titerabfall ca. acht Wochen.

Falldefinition - Beschläseuche der Pferde

Klinisches Bild

Die Beschläseuche gilt als eine ausschließlich venerisch übertragbare, meist chronisch verlaufende durch *Trypanosoma equiperdum* verursachte Erkrankung des Pferdes und anderer Equiden. Der klinische Verlauf ist im Anfangsstadium gekennzeichnet durch eine lokale Entzündung der äußeren Geschlechtsorgane mit schleimigem Ausfluss (lokale Phase), später durch lokale, subkutane ödematöse Schwellungen an Hals, Schulter, Unterbrust und Kruppe (hämatogene/lymphogene Phase) sowie schließlich durch Lähmungsercheinungen (zentralnervöse Phase).

Inkubationszeit: variabel (Wochen bis Monate)

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

Erregernachweis (nur im akuten Stadium der Erkrankung oder Infektion möglicherweise erfolgreich):

- Nachweis erregerspezifischer DNA
- Erregerisolierung

Indirekt über den Nachweis spezifischer Antikörper (nur bei entsprechender Klinik beweisend):

Komplementbindungsreaktion (KBR): von der WOAH empfohlene Methode; laut „**OIE-WOAH** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals“ (**OIE-WOAH** -Manual) ist ein KBR-Titer ab 1 : 5 ($\geq 2+$ -Reaktion, Wärmebindung) als positiv zu beurteilen; laut der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1301 vom 27. September 2018 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) 2018/659 über die Bestimmungen für den Eingang lebender Equiden sowie von Sperma, Eizellen und Embryonen von Equiden in die Union sowie der Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union (EU) 2020/688 ist ein KBR-Titer ab 1 : 5 als positiv zu beurteilen.

- Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): als alternative Methode zugelassen (Methode siehe WOAH Manual)
- Indirect fluorescent antibody test (IFAT) ist als Bestätigungstest geeignet (Methode siehe **OIE-WOAH** Manual)

Zusatzinformation

Das OIE-WOAH Manual bietet weitere Definitionen und Empfehlungen zum Erregernachweis, zu serologischen und molekularen Tests sowie zur Definition eines bestätigten Falls.

Differenzialdiagnose

Infektionen mit anderen Trypanosomen, insbesondere bei Importtieren aus Endemiegebieten von *T. evansi*. Infektionen mit *T. evansi* können einen der Beschläseuche sehr ähnlichen klinischen Verlauf nehmen. Serologisch kann die Differenzialdiagnose aufgrund von kreuzreagierenden Antigenen der Erreger bisher nicht gestellt werden. *T. evansi* kann jedoch anders als *T. equiperdum* nicht nur im akuten Stadium der Infektion im Blut nachgewiesen werden. Daher ist bei Infektion mit *T. evansi* ein direkter Erreger- oder Erregerantigenachweis im Blut z. B. mittels Haematokrit-Zentrifugation oder Mini-Anionenaustauscherchromatographie mit DEAE-Zellulose, Techniken, die für die Diagnose der Schlafkrankheit oder Nagana genutzt werden, mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich.

Epidemiologischer Zusammenhang

Herkunft aus einem Endemiegebiet mit der Möglichkeit, dass das Tier an einem Deckakt beteiligt war.

Voraussetzung für den Verdacht

Positiver Antikörpernachweis in Verbindung mit anamnestischen Anhaltspunkten (epidemiologischer Zusammenhang, Therapieversuche in der Vergangenheit)

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:

Antikörpernachweis in Verbindung mit anamnestischen (epidemiologischen) und klinischen Anhaltspunkten.

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1301 vom 27. September 2018 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) 2018/659 über die Bestimmungen für den Eingang lebender Equiden sowie von Sperma, Eizellen und Embryonen von Equiden in die Union: Titer ab 1 : 5 = positiv.

Beschälseuche der Pferde (*Trypanosoma equiperdum*)

- Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 vom 9. März 2016 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union (EU) 2020/688 vom 17. Dezember 2019
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz, TierGesG) in der derzeit gültigen Fassung

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.de