

Amtliche Methode und Falldefinition

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differentialdiagnose	4
1.4 Diagnostische Indikation	4
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.6 Rechtsgrundlagen.....	4
2. Untersuchungsmaterial	5
3. Untersuchungsgang	6
3.1 Erregernachweis	7
3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	7
3.3 Antikörpernachweis durch Komplementbindungsreaktion (KBR).....	19
Anhang	29
Falldefinition - Lungenseuche der Rinder; <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>)	33

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Mycoplasma mycoides subspecies *mycoides* (Mmm). Es handelt sich dabei um die kleinsten auf zellfreiem Medium wachsenden Bakterien (0,3 bis 0,8 µm), die zur Klasse *Mollicutes* gehören. Sie besitzen keine Zellwand und bilden auf festem Nährmedium typische spiegeleiförmige Kolonien.

1.2 Klinische Symptomatik

Die Lungenseuche ist eine hochkontagiöse bakterielle Erkrankung der Rindergattung, bei der erwachsene Tiere in erster Linie am Atmungsapparat und Kälber vor allem an den Gelenken erkranken. Außer beim Hausrind kommt die Lungenseuche auch beim Büffel, Yak und Bison vor. Die Lungenseuche ist weit verbreitet in Afrika und einigen Ländern Asiens (aktuelles Vorkommen der Krankheit siehe unter [Verbreitungskarte der WOAH für die Lungenseuche der Rinder](#)). In Europa traten die letzten Fälle 1999 in Portugal auf. Weitere Ausbrüche gab es bis in den 90er Jahren in Spanien und Italien. Deutschland ist seit vielen Jahren frei von Lungenseuche. Der letzte Fall in Deutschland stammt aus dem Jahre 1926. Aufgrund des verbreiteten Tierhandels besteht allerdings jederzeit Einschleppungsgefahr für Deutschland.

Der Erreger der Lungenseuche wird primär über ausgehustetes Sekret (aerogene Infektion) übertragen. Während der Inkubationszeit von zwei bis sechs Wochen (teilweise bis zu sechs Monate) wird der Erreger von den gesund erscheinenden Tieren bereits ausgeschieden. Die Krankheit beginnt mit trockenem, kurzem Husten und Fieber. Nach weiteren Wochen zeigen sich deutliche Atembeschwerden gekennzeichnet durch schmerzhaften Husten, Auswurf, schleimig-serumhaltigen Nasenausfluss, hohe Pulsfrequenz, Verstopfung und Durchfall im Wechsel, Abmagerung, geringe Harnausscheidung (dunkelgelb bis braun). Die Futteraufnahme, das Wiederkauen sowie die Milchleistung gehen zurück. Bei jungen Tieren verläuft die Krankheit oft schnell, bei älteren Tieren häufig langsamer. 50 bis 80 % der Fälle enden tödlich, wobei die Mortalitätsrate in neu infizierten Beständen höher ist als in Herden, in denen die Lungenseuche bereits vorher auftrat. Die Seuche breitet sich innerhalb eines Bestandes relativ langsam aus. Genesene chronisch infizierte Tiere bleiben jahrelang Ausscheider und sind eine ständige Ansteckungsquelle.

Bei Kälbern bis zu einem Alter von ca. sechs Monaten stehen meistens Polyarthritiden im Vordergrund. Bei ihnen führt die Krankheit schnell zu schmerzhaften und heißen Umfangsvermehrungen der Gelenke an den Gliedmaßen verbunden mit Lahmheiten (besonders Karpal- und Tarsalgelenke).

Gleichzeitiges Auftreten von Pneumonie-Symptomen bei erwachsenen Rindern und Arthritiden bei Kälbern geben einen wichtigen Hinweis auf das Vorliegen von Lungenseuche bei der klinischen Verdachtsdiagnose.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Grundsätzlich kann zwischen akuten und chronischen Verläufen unterschieden werden, wobei die klinische Diagnose bei chronischem Verlauf ungleich schwieriger ist als bei akuter Lungenseuche. Allerdings gibt es hier viele Übergangsformen.

1.3 Differenzialdiagnose

Für die Differentialdiagnostik relevant sind unspezifische katarrhalische und fibrinöse Pneumonien, Wurmbefall, Rinderpest, Tuberkulose und die pectorale Form der Pasteurellose.

1.4 Diagnostische Indikation

Die Einleitung diagnostischer Untersuchungen wird auf der Grundlage folgender Feststellungen getroffen:

- klinische Symptome
- pathologische Veränderungen
- serologische Befunde
- epidemiologische Befunde

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- benannte Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsämter der Länder (siehe Anhang 1)
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), NRL für die Lungenseuche der Rinder, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Telefon: 03641/804-2100, Telefax: 03641/804-2228

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz)
- Verordnung (EU) 2016/429 des europäischen Parlaments und des Rates vom 09. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 vom 03. Dezember 2018 über die 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) 2020/689 vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen

- Delegierte Verordnung (EU) 2020/687 vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der VO (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen

2. Untersuchungsmaterial

Von lebenden Tieren

ca. 10 ml Nativblut zur Serumgewinnung oder 5 ml Serum

5 ml Pleuralexsudat (Entnahme zwischen 7. und 8. Rippe im unteren Brustbereich)

Nasenabstriche (mit sterilen Nasentupfern)

Von getöteten oder verendeten Tieren

verändertes Lungengewebe am Übergang zum gesunden Gewebe (ca. 4 x 4 x 4 cm)

Lnn. mediastinalis in toto, tributäre Lymphknoten

5 bis 10 ml Brusthöhlenexsudat

10 ml Blut (Herzblut)

von Kälbern auch Gelenkflüssigkeit

Transport

Die Proben sind schnellstmöglich in gekühltem, nicht gefrorenem Zustand an die untersuchende Stelle zu senden.

Das Untersuchungsmaterial muss vorschriftsmäßig in dicht schließenden Behältnissen verpackt und zusammen mit dem Vorbericht und dem Untersuchungsantrag an die zuständige Untersuchungseinrichtung geschickt werden. Versandbehältnis und Probengefäße müssen eindeutig beschriftet sein. Dabei sind folgende Vorschriften einzuhalten:

Gefahrgutverordnung für den Transport auf der Straße bzw. mit der Eisenbahn

Infektionsschutzgesetz

IATA-DGR in der jeweils gültigen Fassung für den Transport auf dem Luftweg

DIN EN 829

Der Einsender sollte zum frühestmöglichen Zeitpunkt das Untersuchungslaboratorium von der bevorstehenden Sendung in Kenntnis setzen.

Im Anschreiben ist anzugeben:

- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. dienstlicher und eventuell privater Telefon- und Faxnummer)
- Was wird eingesandt? (Art des Materials, von welchen Tieren, Anzahl etc.)
- Aus welchem Bestand stammen die Proben?

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)

Zusätzliche Angaben, soweit möglich:

- Wie groß ist der Bestand?
- Art des Bestandes (Zucht-, Mast-, Händlerbestand etc.)?
- Bestehen Kontakte zu Lungenseuche-verseuchten Gebieten?
- Bemerkungen und weitere Hinweise auf eine mögliche Erregereinschleppung.

3. Untersuchungsgang

Die Lungenseuche gilt als **nachgewiesen**, wenn der **Erreger** in der zuständigen Untersuchungseinrichtung zweifelsfrei **identifiziert** wurde. Die zuständige Untersuchungseinrichtung ist das Nationale Referenzlabor für die Lungenseuche der Rinder in Jena.

Serologische Reaktionen in Verbindung mit einem epidemiologischen Kontakt zu einem Lungenseucheausbruch oder mehrere serologisch positive Befunde in einer Rinderherde führen, unabhängig vom Vorliegen klinischer bzw. pathologisch-anatomischer Befunde, zu einem **Lungenseucheverdacht**. Der Verdacht kann nur durch den Amtstierarzt ausgesprochen werden. Dies gilt ebenfalls für die amtliche Feststellung eines Lungenseucheausbruchs. Die KBR ist laut OIE das vorgeschriebene serologische Testverfahren. Alternativ kann ein kommerziell verfügbarer kompetitiver ELISA nach den Vorgaben der OIE angewendet werden. Dieser ist allerdings für Deutschland nicht zugelassen und somit nur im Nationalen Referenzlabor Jena bzw. nur nach Ausnahmegenehmigung in den entsprechenden Landesbehörden anwendbar.

Erregernachweis bei Verdacht auf Lungenseuche

Die Anzucht von Mykoplasmen ist in den meisten Untersuchungsämtern möglich und dauert im Durchschnitt fünf bis sieben Tage, die darauffolgende Erregerdifferenzierung noch weitere zehn bis zwölf Tage. Ein negatives Ergebnis wird innerhalb von zehn Tagen ausgewiesen. Der positive Nachweis kann bis zu 20 Tage in Anspruch nehmen.

Wichtiger Hinweis: Bei Verdacht eines Erstausbruchs ist Organmaterial einschließlich evtl. vorhandener oder verdächtiger bereits isolierter Kulturen, verdächtige Seren bzw. Blutproben parallel direkt an das Referenzlabor für die Lungenseuche der Rinder zu senden (FLI, Standort Jena, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Tel. 03641-804-2100). Die Proben sind vorher telefonisch anzumelden (siehe auch unter Untersuchungsmaterial).

Im positiven Fall ist mittels PCR ein sicherer Nachweis innerhalb von 48 Stunden möglich. Die PCR wird im Nationalen Referenzlabor für Lungenseuche durchgeführt.

Werden in den Untersuchungsämtern bei der serologischen Untersuchung auf Lungenseuche mittels KBR positive Proben festgestellt, so sind diese Tiere bis zur Abklärung im Nationalen Referenzlabor als Verdachtsfälle einzustufen und der entsprechende Bestand ebenfalls als verdächtig für die Lungenseuche zu behandeln, auch wenn keine weiteren Hinweise für das Vorliegen eines Lungenseucheausbruchs sprechen. Dem Referenzlabor sind in diesem Fall neue Blutproben (ohne Gerinnungshemmer) sowie Nasentupfer der entsprechenden Tiere zuzuleiten.

3.1 Erregernachweis

Anzucht

Als Mykoplasmen-Nährmedien werden Medium B-Bouillon (Anhang 2) und -Agar (Anhang 3) verwendet. Zur Unterdrückung der bakteriellen Begleitflora muss bei der Primärisolierung dem flüssigen Nährmedium unmittelbar vor der Beimpfung Penicillin (1000 IE/ml) zugesetzt werden.

Zur Beimpfung sind möglichst kleine Stücke des Untersuchungsmaterials in das flüssige Nährmedium einzubringen, d. h. je ein stecknadelkopfgroßes Organstückchen (Die Ausgangsproben sollten vor dem Zerkleinern zwecks Beseitigung von Begleitflora kurz abgeflammt werden.)

Das beimpfte flüssige Nährmedium wird vier bis fünf Tage bei 37 °C bebrütet. Danach wird die Kultur auf Medium B-Agar übertragen und anschließend zwei bis vier Tage bei 37 °C in feuchter Umgebung und bei 3 bis 5 % CO₂ inkubiert.

Das Mykoplasmenwachstum kann auf der Agarplatte mikroskopisch mit einer Lupenvergrößerung bei leicht dezentriertem grünem Licht beurteilt werden. *Mmm* entwickelt auf festen Nährmedien durchscheinende Kolonien von 0,1 bis 1 mm Durchmesser, welche meist als raue, vakuolisierende granuläre Formen erscheinen.

3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis wird nur im Nationalen Referenzlabor durchgeführt.

3.2.1 DNA-Isolierung

Geräte, Materialien und Reagenzien

- Manual des High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Zentrifuge für Eppendorf-Gefäße (wenn möglich mit Kühlung)
- Vortex-Schüttler
- Gerät zur DNA-Konzentrationsmessung (z. B. Eppendorf BioPhotometer oder Nanodrop1000, Peqlab, Wilmington, USA)
- FastPrep 24 Homogenisator (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) oder vergleichbarer Homogenisator
- AJ Lysis Tubes, Analytik Jena oder vergleichbare Gefäße zum Homogenisieren von Gewebeproben
- Präzisionspipetten, verschiedene Größen

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

- Filter-Tips, steril und DNase-frei (PCR-clean),
- Handschuhe
- Eppendorf-Tubes, 1,5 ml, 2 ml, steril und DNase-frei (PCR-clean)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)

- Zellpuffer, steril (pH 7,4):
 - 1000 ml 0,1M Na₂HPO₄-Lösung
 - + 222 ml 0,1M KH₂PO₄-Lösung
- Entionisiertes Wasser

Durchführung

Alle Arbeitsschritte bis zur Zugabe des Lysepuffers werden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt und DNA-Extrakte bei -20 °C aufbewahrt.

Vorbereitungsschritte für alle Isolierungen:

- mit Einmalhandschuhen arbeiten
- Proteinase K (Gefäß 3 aus Roche-Kit) in 4,5 ml bidest. H₂O aufnehmen, aliquotieren und bei -20 °C lagern
- vor Erstgebrauch 80 ml Ethanol p. A. zu dem Waschpuffer (Gefäß 4, blauer Deckel) geben
- bei Beginn der DNA-Isolierung den Elutionspuffer (Gefäß 5) auf 70 °C vorwärmen

DNA-Isolierung aus Gewebe

- 25 - 50 mg Gewebe im 1,5 ml-Tube einwiegen und mit der Schere soweit wie möglich zerkleinern bzw. mit AJ-Lysis Tubes im FastPrep-24 2 x 30 s homogenisieren,
- 200 µl Gewebe-Lysepuffer (Gefäß 1, weißer Deckel) und 40 µl Proteinase K-Lösung zugeben
- mindestens 1 h bei 55 °C inkubieren (eventuell auch 2 - 3 h oder bei 37 °C über Nacht)
- 200 µl Bindungspuffer (Gefäß 2, grüner Deckel) zugeben, mischen und 10 min bei 70 °C inkubieren (Elutionspuffer 5 kann dabei mit vorgewärmt werden)
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- nicht lösliche Gewebestücke mittels einer Pipettenspitze entfernen, restliche Flüssigkeit mittels einer 1 ml-Pipette in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren (eventuell auch länger und bei etwas höherer Drehzahl, falls der Filter vom Gewebe verstopft wird)
- Durchlauf verwerfen, Sammelbehälter wiederverwenden
- 500 µl Inhibitorpuffer in das Filter-Tube pipettieren
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- 500 µl Waschpuffer in das Filter-Tube pipettieren (Gefäß 4, blauer Deckel)
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- Waschschrift wiederholen

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

- anschließend 10 s bei max. Geschwindigkeit (13000 rpm) zentrifugieren
- Filter-Tube in ein sauberes 1,5 ml-Tube einsetzen
- zur Elution der Nukleinsäuren 200 µl des auf 70 °C vorgewärmten Elutionspuffers in das Filter-Tube pipettieren
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- die Nukleinsäuren sind stabil und können direkt in der PCR analysiert oder kurzzeitig bei 4 °C bzw. langfristig bei -20 °C gelagert werden

DNA-Isolierung aus Kulturflüssigkeit

- aus 6 ml 2 - 5 Tage alter Bouillon-Kultur 2 x 2 ml in Eppendorf-Tubes überführen und bei 13200 rpm 20 min zentrifugieren
- Sterilkontrolle auf Platte anlegen und restliche Kultur als Rückstellprobe bei -20 °C einfrieren
- Zellpellet nach Zentrifugation zweimal mit PBS waschen
- Pellet in 200 µl Lysepuffer lösen und 40 µl Proteinase K-Lösung zugeben
- mindestens 1 h bei 55 °C inkubieren
- 200 µl Bindungspuffer hinzufügen und mischen
- 10 min bei 70 °C inkubieren
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- weiter wie bei DNA-Isolierung aus Gewebe (3.2.1)

DNA-Isolierung aus Milch

- 300 µl Milch mit 200 µl Lysepuffer und 40 µl Proteinase K mischen
- 200 µl Bindungspuffer hinzufügen, mischen
- 10 min bei 70 °C inkubieren
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- weiter wie bei DNA-Isolierung aus Gewebe

DNA-Isolierung aus anderer Körperflüssigkeit

- 200 µl Körperflüssigkeit (bei weniger Volumen mit Zellpuffer auffüllen) in ein 1,5 ml-Tube pipettieren
- 200 µl Bindungspuffer (Gefäß 2, grüner Deckel) und 40 µl Proteinase K-Lösung zugeben
- nach Proteinase K-Zugabe sofort gut mischen und 10 min bei 70 °C inkubieren (Elutionspuffer 5 kann dabei mit vorgewärmt werden)
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- weiter wie bei DNA-Isolierung aus Gewebe

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

DNA-Isolierung aus Nasentupfern

- Nasentupfer mit oder ohne Transportmedium
- 1 ml-Pipettenspitze zur Hälfte abschneiden, in dieser halben Spitze im Tube Tupfer 2 min bei 1200 rpm zentrifugieren, um die gesamte Flüssigkeit aus dem Tupfer zu gewinnen
- Probenflüssigkeit vereinigen und 15 - 20 min bei 13200 rpm (höchste Drehzahl) zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 200 µl Lysepuffer (Roche-Kit) aufnehmen, 40 µl Proteinase K-Lösung und 200 µl Bindungspuffer (Roche-Kit) zugeben
- gut mischen und 10 min bei 70 °C inkubieren (Elutionspuffer 5 kann dabei mit vorgewärmt werden)
- mit 100 µl Isopropanol vermischen
- in das zusammengesetzte Filter-Tube geben (→ Säule auf Sammelbehälter setzen)
- weiter wie bei DNA-Isolierung aus Gewebe

Ergebnis

Photometrische Messung:

- erfolgt mittels Photometer (z. B. BioPhotometer von Eppendorf) zur Überprüfung der Reinheit und zur Einstellung eines definierten DNA-Gehaltes bei 260 nm gegen Leerwert Aqua dest., oder mittels Nanodrop1000 (direkte Messung in 2 µl DNA-Extrakt)
- der Absorption von 1 OD entsprechen ca. 50 µg/ml DNA
- mit dem Verhältnis A260/A280 kann die Reinheit der DNA abgeschätzt werden, dieser Wert sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen
- die Nukleinsäuren sind stabil und können direkt in der PCR analysiert oder bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert werden

3.2.2 Konventionelle PCR

Geräte, Materialien und Reagenzien

- Thermocycler (z. B. Biometra Uno, T3)
- Eppendorf-Zentrifuge (wenn möglich mit Kühlung)
- Vortexer
- Präzisionspipetten, verschiedene Größen
- passende Tips, steril und DNase-frei (PCR-clean), z. B. Eppendorf
- Handschuhe
- Eppendorf-Tubes, 0,2 ml, steril
- *Mollicutes*-spezifische PCR: Promokine Kit II
- *Mycoides*-Cluster-PCR und *Mmm*-PCR:
- dNTP-Mix, Taq-Polymerase, 10 x Taq-Polymerase-Puffer (z. B. 5 Prime, VWR)

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Primer:

für *Mycooides*-Cluster-PCR

F-REAP: 5' GAAACGAAAGATAATACCGCATGTAG 3'

R-REAP: 5' CCACTTGTGCGGGTCCCCGTC 3'

für *Mmm*-spezifische PCR

SC3NEST1-L: 5' ACA AAA AGA AGA TAT GGT GTT GG 3'

SC3NEST1-R: 5' ATC AGG TTT ATC CAT TGG TTG G 3'

Es ist für alle Ansätze entionisiertes Wasser einzusetzen.

Durchführung

- die Template-Zugabe erfolgt unter der Box
- mit Einmalhandschuhen arbeiten
- Primer vorverdünnen: Stammlösung 100 pmol/µl, Verdünnung 1 : 5 auf 20 pmol/µl mit Wasser
- DNA vorverdünnen: entsprechend der photometrischen Messung auf 10 ng DNA/µl einstellen

a) Durchführung der Mollicutes-spezifischen PCR mit dem PCR Mycoplasma Test Kit II:

- jeweils 19 µl H₂O und 5 µl Promokine-Reaction-Mix in PCR-Tubes vorlegen
- Template: je 1 µl DNA-Extrakt der Probe auf 10 ng/µl eingestellt oder unverdünnt
- Negativkontrolle: 1 µl H₂O
- Positivkontrolle: 0,5 µl der Positive Template Control (im Kit) und 0,5 µl H₂O
- vortexen, kurz abzentrifugieren und in den vorprogrammierten Cyclor stellen

Temperaturprofil im Thermocycler:

30 s 94 °C

30 s 94 °C

120 s 60 °C

60 s 72 °C

300 s 72 °C

} → 35-mal

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

b) Durchführung der Mycoides-Cluster-spezifischen PCR

5-Prime-DNA Polymerase-System (z. B. VWR International GmbH)

25 µl Reaktionsvolumen

Mastermix

	Reaktionsvolumen (µl)	Endkonzentration
H ₂ O	19,9	-
Puffer 10x	2,5	1x
MgCl ₂ (im Puffer)	-	1,5 mM - 2 mM
dNTP (10 mM)	0,5	200 µM
F-REAP (20 pmol)	0,5	400 µM
R-REAP (20 pmol)	0,5	400 µM
Polymerase (5 U/µl)	0,1	0,5 U

- jeweils 24 µl Mastermix in PCR-Tubes vorlegen
- Template: je 1 µl DNA-Extrakt der Probe auf 10 ng/µl eingestellt oder unverdünnt
- Negativkontrolle: 1 µl H₂O
- Positivkontrolle: 1 µl (10 ng/µl) *M. mycoides* subsp. *mycoides* Typstamm PG1
- vortexen, kurz abzentrifugieren und in den vorprogrammierten Cycler stellen

Temperaturprofil im Thermocycler:

120 s 96 °C

30 s 96 °C

30 s 59 °C

60 s 68 °C

120 s 68 °C

} → 35-mal

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

c) Durchführung der *Mmm*-spezifischen PCR

5-Prime-DNA Polymerase-System

25 µl Reaktionsvolumen

Mastermix

	Reaktionsvolumen (µl)	Endkonzentration
H ₂ O	19,9	-
Puffer 10x	2,5	1x
MgCl ₂ (im Puffer)	-	1,5 mM - 2 mM
dNTP (10 mM)	0,5	200 µM
SC3NEST1-L (20 pmol)	0,5	400 µM
SC3NEST1-L (20 pmol)	0,5	400 µM
Polymerase (5 U/µl)	0,1	0,5 U

- jeweils 24 µl Mastermix in PCR-Tubes vorlegen
- Template: je 1 µl DNA-Extrakt der Probe auf 10 ng/µl eingestellt oder unverdünnt
- Negativkontrolle: 1 µl H₂O
- Positivkontrolle: 1 µl (10 ng / µl) *Mmm* Typstamm PG1

Temperaturprofil im Thermocycler:

120 s 96 °C

30 s 96 °C

30 s 52 °C

40 s 68 °C

120 s 68 °C

} → 35-mal

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Geräte, Materialien und Reagenzien

- Elektrophoresekammer (z. B. Biometra, Biozym)
- Stromversorgungsgerät
- Mikrowelle
- Gel-Auswertesystem (z. B. Bio Imaging System von Syngene)
- Maßkolben (1 l)
- Erlenmeyerkolben (300 ml, 500 ml)
- Messzylinder (25 ml, 100 ml)
- Parafilm
- Präzisionspipetten, verschiedene Größen
- passende Tips, steril und DNase-frei (PCR-clean), z. B. Eppendorf
- Handschuhe (Nitrilhandschuhe → beständig gegenüber Ethidiumbromid)
- Agarose (PeqGold Universal Agarose von Peqlab)
- 10 x TBE-Puffer
- dest. H₂O
- Ethidiumbromid (Tropfflasche, z. B. Eurobio)
- Molekulargewichtsmarker: 1 kb (100 bp + 1,5 kbp) Marker, Genaxxon, gebrauchsfertig
- Entionisiertes Wasser für alle Reaktionsansätze

Ansetzen der Lösungen

- Herstellung des Laufpuffers (1 x TBE-Puffer): 100 ml 10 x TBE-Puffer ad 1000 ml dest. Wasser
- Zusammensetzung des Agarose-Gels:

Gelkonzentration	1,5 %
Volumen	100 ml
Agarose	1g
dest. Wasser	90 ml
10x TBE-Puffer	10 ml
Ethidiumbromid	2 Tr.

Durchführung

- Elektrophoresekammer zusammensetzen, passenden Kamm auswählen
- Agarose einwiegen, mit 1 x TBE-Puffer im Erlenmeyerkolben lösen
- in der Mikrowelle bei 600 W zum Kochen bringen, ca. 30 s kochen
- Ethidiumbromid zugeben, Kolben vorsichtig schwenken
- zügig und luftblasenfrei in die Elektrophoresekammer gießen, etwa 0,4 - 0,6 cm dick
- und mind. 1 h polymerisieren lassen
- Kamm herausziehen, Laufpuffer in die Elektrophoresekammer füllen bis der Puffer ca. 0,5 cm über dem Gel steht
- je 1 µl Probenpuffer mit 5 µl Probe auf Parafilm mischen und in die Slots pipettieren
- Laufdauer und einzustellende Spannung sind abhängig von Größe und Dicke des Gels und der Beschaffenheit der Kammer → Hinweise des Herstellers beachten
- Spannung liegt zwischen 80 und 150 V, die Dauer des Laufes zwischen 30 min und 2 h
- Faustregel für einzustellende Spannung: 5 V/cm Elektrodenabstand
- die Bromphenolblau-Front sollte mindestens zur Hälfte des Gels gewandert sein; bei schlechtem Trennergebnis kann das Gel nochmals in die Kammer gelegt und die Proben weiter getrennt werden; um eine gleichmäßige Verteilung des Ethidiumbromids im Gel zu erreichen (wandert entgegengesetzt zur DNA), kann dem Laufpuffer 0,5 mg/l Ethidiumbromid zugesetzt werden (für einen gleichmäßigen und klaren Hintergrund auf dem Gel)
- das Gel wird unter UV-Licht mit Hilfe eines geeigneten Gel-Auswertesystems analysiert und dokumentiert

Ergebnis und Kontrolle

Im UV-Licht sind bei positiven Reaktionen spezifische Banden zu erkennen:

- a) für die *Mollicutes*-spezifische PCR: 270 bp
- b) für die *Mycoides*-Cluster-spezifische PCR: 785 bp
- c) für die *Mmm*-spezifische PCR: 717 bp

Bei jedem Lauf muss die Positivkontrolle (DNA vom Typstamm *Mmm* PG1) ebenfalls die spezifische Bande aufweisen, während die Negativkontrolle keine Bande zeigen darf. Sollte die Negativkontrolle PCR-positiv sein, ist das gesamte Amplifikationsexperiment mit frischen Reagenzien zu wiederholen.

Eine diagnostische Probe ist *Mmm*-positiv, wenn alle drei Systeme, oder mindestens die *Mmm*-spezifische und eine der beiden anderen PCRs ein spezifisches Amplikon zeigen.

3.2.4 TaqMan Real-Time-PCR

Geräte, Materialien und Reagenzien

- Real-Time-Thermocycler
- Vortexer, Tischzentrifuge
- Präzisionspipetten, verschiedene Größen
- passende Tips, steril und DNase-frei (PCR-clean)
- Handschuhe
- Eppendorf-Tubes, 0,2 ml, bzw. Platten, steril
- Master Mix (z. B. QuantiFast® Multiplex PCR Master Mix, Qiagen, Hilden)
- Primer (z. B. von Eurofins MWG Operon, Ebersbach) und Sonden (z. B. von TIBMolbiol, Berlin):

Tabelle 1: Primer und Sonden

Target	Primer/Sonden	Sequenz (5'-3')
MSC_1046 (lppQ)	MSC_1046-S (lppQ-S)	ATCAAGATATTTTCGAGTTGAAATGTAAG
	MSC_1046-R2 (lppQ-R2)	TGTATATTTTTTAGATTTCAATCTGAAAGTG
	MSC_1046-TM1 (lppQ-TM1)	FAM-TTTCAGCTCGATAAAACATATTT-BBQ1
MSC_0136 (lppD)	MSC_0136-F (DF)	AACACAAAAAACCGAACAGCCT
	MSC_0136-R (DR)	AGCTTATCAGGAACTTTTTTAACGTA
	MSC_0136-TM (DTM)	Cy5-TGAGATAGTTCAAATTGGCTTT-BBQ1
IC	EGFP-1F	GACCACTACCAGCAGAACAC
	EGFP-10R	CTTGTACAGCTCGTCCATGC
	EGFP-Hex	HEX-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1

IC Template: Lösung: 2×10^4 Kopien EGFP-Plasmid, 0,25 µl je 25 µl Reaktionsansatz

(Direktbezug von Dr. B. Hoffmann, Riems oder Kauf von Intype IC-DNA, Labor Diagnostik Leipzig)

Es ist für alle Ansätze entionisiertes Wasser einzusetzen.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Durchführung

- Mastermixe unter der PCR-Box pipettieren
- die Template-Zugabe erfolgt unter der Box
- mit Einmalhandschuhen arbeiten
- *Mmm*-spezifische Primer und Sonden vorverdünnen: Stammlösung 100 pmol/μl, Verdünnung 1 : 10 auf 10 pmol/μl mit Wasser
- Herstellung des IC2-Mixes (beinhaltet Primer und Sonde für Kontrolltarget EGFP): 100 μl Primer EGFP1-F (100 pmol/μl), 100 μl Primer EGFP10-R (100 pmol/μl), 50 μl Sonde EGFP-HEX (100 pmol/μl), mit H₂O auf 1 ml auffüllen, aliquotieren
- PCR-Ansatz 25 μl: 3,75 μl H₂O
 - 12,5 μl Mastermix (z. B. QuantiTect)
 - 1 μl Primer lppQ-S (Endkonzentration 400 nM)
 - 1 μl Primer lppQ-R2 (Endkonzentration 400 nM)
 - 1 μl Primer DF (Endkonzentration 400 nM)
 - 1 μl Primer DR (Endkonzentration 400 nM)
 - 0,75 μl Sonde lppQ-TM1 (Endkonzentration 300 nM)
 - 0,75 μl Sonde DTM (Endkonzentration 300 nM)
 - 2 μl IC2Mix
 - 0,25 μl IC2 Template
 - 1 μl Proben-Template
- Mitführen einer Standardreihe (Doppelbestimmung) bei jedem Lauf: *Mmm*-DNA in Konzentrationen von 1 fg bis zu 1 ng (spektrophotometrisch bestimmt, ist gleichzeitig Positivkontrolle)
- Doppelbestimmung für jede Probe
- Negativkontrollen als Doppelbestimmung mitführen, bei hohem Probenaufkommen alle 20 - 30 Reaktionen wiederholen
- beide *Mmm*-spezifischen Amplifikationen können auch einzeln oder unabhängig voneinander durchgeführt werden, die fehlenden Volumina sind dann mit H₂O zu ergänzen.

Temperaturprofil

5 min	95 °C	} 45-mal
20 s	95 °C	
45 s	57 °C	
45 s	68 °C	

Ergebnis und Kontrolle

- Die Testergebnisse werden mit Hilfe der Stratagene Software MxPro4 ausgewertet. Ein positiver Befund liegt vor, wenn die Ct-Werte (Schnittpunkt von Amplifikationskurve und Schwellenwert) in beiden Ansätzen einer Probe sowohl für das Target lppQ (Signal FAM) als auch für das Target lppD (Signal Cy5)

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

kleiner als 39 sind. Da der lppD-Assay eine etwas höhere Sensitivität als der lppQ-Assay besitzt, ist es bei geringem Erregergehalt möglich, dass der Ct-Wert für lppQ größer als 39 ist. Sind die Ct-Werte beider lppD-Ansätze dann aber kleiner 39, so ist die Probe positiv. Ist der Ct-Wert eines Ansatzes größer 39 und der des zweiten Ansatzes kleiner 39, so ist diese Probe fraglich und die Real-Time-PCR-Analyse ist für diese Probe zu wiederholen. Proben, die in beiden Ansätzen der zwei Targets Ct-Werte größer 39 zeigen, sind als negativ zu betrachten (s. Tabelle 2).

- Die Amplifikation der internen Kontrolle (IC) hilft abzuschätzen, ob Inhibitoren im Reaktionsmix den Ablauf der PCR beeinträchtigen. Die Ct-Werte der IC (Signal HEX) sollen sich in einem Bereich von 26 bis 32 bewegen und untereinander relativ einheitlich sein (Unterschied zwischen den Proben eines Laufes max. 2 Einheiten). Sobald eine als *Mmm*-negativ beurteilte Probe einen zu hohen Ct-Wert der IC zeigt, ist diese zu wiederholen. Eine Probenserie ist außerdem zu wiederholen, wenn mindestens eine NTC einen Ct-Wert kleiner 40 zeigt.

Tabelle 2: Richtlinie zur Bewertung der Ergebnisse

Ct-Wert des lppQ-Signals (FAM)	Ct-Wert des lppD-Signals (Cy5)	Bewertung
2x < 39	2x < 39	positiv
2x > 39, < 43	2x < 39	positiv
1x < 39, 1x > 39	1x < 39, 1x > 39	fraglich positiv (Wiederholung)
2x > 39	2x > 39	negativ

Angaben zur Messunsicherheit

Die Intra-Assay-Varianzkoeffizienten liegen für den lppD-Assay zwischen 1,1 und 2,6 % und für den lppQ-Assay zwischen 0,7 und 2,3 %. Als Inter-Assay-Varianzkoeffizienten wurden für den lppD-Assay 1,1 - 2,4 % und für den lppQ-Assay 0,8 - 2,9 % ermittelt. Die sich daraus ergebenden Messunsicherheiten beeinflussen nicht die Aussagekraft der PCR-Ergebnisse.

Ansonsten ergeben sich Messunsicherheiten wie bei allen vergleichbaren Methoden z. B. aus gerätespezifischen Ungenauigkeiten hinsichtlich abweichender Temperaturverteilungen innerhalb des Thermoblocks, durch Abweichungen innerhalb des zulässigen Toleranzbereiches bei allen Pipettierschritten sowie durch unbekannte Inhibitoren im Probenansatz. Durch das Mitführen von allen erforderlichen Kontrollen (siehe 3.2 Durchführung) und regelmäßiger Überprüfung bzw. Kalibrierung der verwendeten Gerätschaften können die zu erwartenden Abweichungen bzw. Messunsicherheiten in einem vertretbaren Rahmen gehalten werden und beeinflussen ebenfalls nicht die Aussagekraft der Ergebnisse aus der Real-Time-PCR.

3.3 Antikörpernachweis durch Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die KBR für die Lungenseuche wird in der Regel zuerst in den von den Landesbehörden festgelegten staatlichen Untersuchungsämtern durchgeführt (Anhang 1). Die notwendigen Reagenzien (Antigen, positive und negative Kontrollseren) werden vom Nationalen Referenzlabor in Jena für die aufgeführten Untersuchungsämter zur Verfügung gestellt.

Zur Feststellung des Verdachts eines Lungenseucheausbruchs bzw. zur Eingrenzung des Kreises verdächtiger Tiere kann die jeweilige hauseigene Arbeitsvorschrift verwendet werden.

Nachfolgend wird der prinzipielle Ablauf am Beispiel der von der OIE empfohlenen Mikromethode dargestellt, welche auf das Verfahren nach Campbell und Turner (1953) zurückgeht.

Geräte/Gebrauchsmaterialien

- Zentrifuge, Wasserbad $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$; Wasserbad $58\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$;
- Waage; heizbarer Magnetrührer; Kühlschrank $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$; Gefrierschrank $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$
- Mikrotiterplatten (U-Form), Ablesespiegel für Mikrotiterplatten; Bechergläser (30 ml - 800 ml);
- Meßzylinder (50 - 250 ml); Kulturröhrchen (12 ml);
- Zentrifugenröhrchen (12 ml); Ständer für Röhrchen, Klebefolie zum Abkleben der Mikrotiterplatten, Meßpipetten (1, 5 und 10 ml), Kolbenhubpipetten (10 - 1000 μl), entsprechende Pipettenspitzen, Mehrkanalpipette 8-Kanal (20 - 100 μl), Multistepper 8-Kanal 25 - 125 μl , Pipettierhilfe;
- Erlenmeyerkolben, Stehkolben, Bechergläser, Mikrotiterplatten (U-Form, 8 x 12 Wells), feuchte Kammer

Reagenzien/Rezepturen

Alseverlösung für Hammelerythrozyten:

Dextrose	18,66 g
NaCl	4,18 g
Natriumcitrat	8,00 g
Aqua bidest.	1000 ml

Alle Reagenzien nach gründlichem Mischen sterilfiltrieren oder autoklavieren.

KBR-Puffer: kommerziell verfügbar (z. B. Virion/Serion, Würzburg)

Komplement: (z. B. Fa. Virion/Serion) Jede Charge ist vor erstmaligem Gebrauch auszuwerten (siehe dort). Bei Titerverlust empfiehlt sich eine erneute Auswertung.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Ambozeptor: (z. B. Fa. Virion/Serion) Die erforderliche Verdünnung wird vom Hersteller angegeben, so dass keine Austitration erforderlich ist. Die Endverdünnung sollte 12HD50 aufweisen (50 % hämolytische Dosis) pro 25µl.

Antigene sowie negative und positive Kontrollseren: werden im Nationalen Referenzlabor hergestellt und den Untersuchungsämtern kostenlos zur Verfügung gestellt. Angaben zum Auflösen der lyophilisierten Kontrollseren, die erforderlichen Titer des positiven Kontrollserums sowie die Gebrauchsverdünnung des Antigens sind auf den jeweiligen Ampullen vermerkt.

Hammelblut:

Hammelblut	37,5 ml
Alseverlösung	62,5 ml

Eine sterilisierte Schraubflasche mit einer Markierung bei 100 ml wird mit Alseverlösung befüllt und mit Hammelblut direkt aus der Kanüle auf 100 ml aufgefüllt. Das Blut wird aus der *Vena jugularis* gewonnen. Um Kontaminationen vorzubeugen, gibt man 200 000 IE/lm Penicillin G hinzu. Das so gewonnene Hammelblut hält sich bei Kühlschranktemperatur etwa 10 - 14 Tage. Für den Einsatz im hämolytischen System muss es jedoch mindestens 24 h alt sein.

Alternativ kann eine 1%ige oder 50%ige Schaf-Erythrozytensuspension der Firma Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH (Ochsenhausen) verwendet werden.

Hämolytisches System (HS):

- Hammelblut in Alseverlösung bei 900 x g für 10 Minuten zentrifugieren
- 3 - 5 x waschen in KBR-Puffer (bis Überstand wasserklar ist), dazwischen jeweils 10 min zentrifugieren bei 900 x g
- Ambozepter nach Herstellerangaben verdünnen und Gebrauchsverdünnung herstellen
- herstellen einer 1%igen Hammelerythrozytensuspension mit KBR-Puffer - zum Gebrauch wird diese mit gleichem Volumen der Ambozeptor-Gebrauchsverdünnung gemischt und 15 min bei 37 °C ± 1 °C stehen gelassen (Sensibilisierung)
- bei getrennter Aufbewahrung von Erythrozytensuspension und Ambozeptorverdünnung können diese bis zu 48 h nach Herstellung verwendet werden.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Durchführung

Anmerkung: Alle Reagenzien sind vor der Verwendung auf Raumtemperatur zu erwärmen.

Komplementauswertung

Die Komplementauswertung dient der Feststellung der Komplementgebrauchsverdünnung für den Hauptversuch in Gegenwart der entsprechenden Antigengebrauchsverdünnung. Zuerst wird das Komplement nach den Angaben des Herstellers aufgelöst, aliquotiert und bei -20 ± 5 °C gelagert. Zur Komplementauswertung wird eine 1 : 10-Verdünnung für die Reihe A und eine 1 : 20-Verdünnung für die Reihe B der Komplementstammlösung mit KBR-Puffer angesetzt. Das Komplement wird mehreren Konzentrationsstufen je nach den Angaben zum verwendeten Antigen in der Kältebindung oder Wärmebindung geprüft. Die Durchführung der Komplementauswertung erfolgt in Mikrotiterplatten mit U-Boden. In der folgenden beispielhaften Tabelle ist die Herstellung von 2 x 9 Verdünnungsstufen dargestellt. Das Well Nr. 10 ist reserviert für die Kontrolle des hämolytischen Systems (HS-Kontrolle).

	Reihe	Spalte Nr.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	HS-Kontrolle
KBR-Puffer [μ l]	A	40	35	30	25	20	15	10	5	0	75
KBR-Puffer [μ l]	B	40	35	30	25	20	15	10	5	0	75

Berechnen der erforderlichen Menge an Komplement für 9 Wells 1 : 50 und 9 Wells 1 : 100.

	Reihe	Spalte Nr.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	HS-Kontrolle
Kompl. 1:50 [μ l]	A	10	15	20	25	30	35	40	45	50	0
Kompl. 1:100 [μ l]	B	10	15	20	25	30	35	40	45	50	0

Das Antigen verdünnen wie dort angegeben und in alle Wells einfüllen.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

	Reihe	Spalte Nr.									
											HS-Kontrolle
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antigen [μl]	A	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
Antigen [μl]	B	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0

Anschließend die Platte abdecken und für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad bzw. im Brutschrank in einer feuchten Kammer (Wärmebindung) oder über Nacht bei $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kältebindung) inkubieren.

Achtung: Auf dem Antigen ist vermerkt, welche Inkubationsvariante anzuwenden ist.

Danach das vorbereitete hämolytische System in alle Wells einfüllen.

	Reihe	Spalte Nr.									
											HS-Kontrolle
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HS [μl]	A	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
HS [μl]	B	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Platte abdecken und 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad schütteln. (Die Erythrozyten dürfen sich während der Inkubationsphase nicht absetzen.)

Platte entweder 30 min bis 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen, einige Stunden bei $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (z. B. über Nacht) oder für 5 min bei $900 \times g$ abzentrifugieren (Erythrozytensedimentation)

Auswertung mit Ablesespiegel

Auswertung

Es wird das Well mit der niedrigsten Komplementkonzentration bzw. der höchsten Komplementverdünnung bestimmt, das eine komplette Hämolyse aufweist. **Ausgewählt wird zur Herstellung der Gebrauchsverdünnung die nächst niedrigere Verdünnungsstufe.** Die ermittelte Gebrauchsverdünnung entspricht dann einer Konzentration von zwei Komplementeinheiten. Zum Ansetzen von 1; 0,5 und 0,25 Komplementeinheiten muss dann entsprechend mit KBR-Puffer verdünnt werden (siehe Hauptversuch). Durch Zugabe des Proben volumens im Hauptversuch ergibt sich dann eine Konzentration von einer Komplementeinheit bei den eigentlichen Tests.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Die folgende Tabelle enthält Beispiele für Verdünnungen des Komplements zur Ermittlung der Gebrauchsverdünnung für den Hauptversuch. Es ist die höchste Verdünnungsstufe zu bestimmen, bei der noch eine vollständige Hämolyse vorliegt. Als Komplementgebrauchsverdünnung wird die nächst niedrigere Verdünnungsstufe verwendet. Die Kontrolle vom HS darf keine Hämolyse aufweisen.

	Reihe	Spalte Nr.								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Komplement- verdünnung	A	1 : 50	1 : 33	1 : 25	1 : 20	1 : 16	1 : 14	1 : 12	1 : 11	1 : 10
Komplement- verdünnung	B	1 : 100	1 : 66	1 : 50	1 : 40	1 : 33	1 : 28	1 : 15	1 : 22	1 : 20

Beispiel: höchste Verdünnungsstufe mit 100% Hämolyse: 1:25

Gebrauchsverdünnung: 1:20

Hauptversuch

- Kontroll- und Probandenseren mit KBR-Puffer 1 : 5 verdünnen und im Wasserbad bei 58 °C ± 1 °C inaktivieren (30 - 50 min)
- Trennlinie zwischen Well 10 und 11 von A bis H ziehen

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Arbeitsschritte aufgeführt:

Arbeitsschritte	Spalte Nr.								
								Serumkontrolle auf Eigenhemmung	
								1 : 5	1 : 10
	1	2	3	:	:	:	10	11	12
1. KBR-Puffer [µl]	-	25	25	:	:	:	25	-	25
2. Serum [µl]	50	-	-	:	:	:	-	50	-

3. Titration des Serums

- von 1 nach 10 und von 11 nach 12 durch Übertragung von 25 µl und Verwerfen von 25 µl aus den Wells 10 und 12
- Titration der Komplementkontrollen (siehe bei Kontrollen)
- beim Titrieren mind. 3 x mischen durch Aufziehen und Abgeben mit der Pipette!

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Arbeitsschritte	Spalte Nr.								Serumkontrolle auf Eigenhemmung	
	1	2	3	:	:	:	10	11	12	
4. KBR-Puffer [μ l]	-	-	-	:	:	:	-	25	25	
5. Antigen [μ l]	25	25	25	:	:	:	25	-	-	
6. Kompl. [μ l]	25	25	25	:	:	:	25	25	25	

7. Schütteln und abgedeckte Platte über Nacht bei $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren (Kältebindung), danach die Platte wieder auf Raumtemperatur erwärmen oder für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad oder im Brutschrank in einer feuchten Kammer (Wärmebindung).

Achtung: Auf dem Antigen ist vermerkt, welche Inkubationsvariante anzuwenden ist.

Arbeitsschritte	Spalte Nr.								Serumkontrolle auf Eigenhemmung	
	1	2	3	:	:	:	10	11	12	
8. HS [μ l]	50	50	50	:	:	:	50	50	50	

9. Schütteln, abdecken und Inkubation 20 - 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad oder im Brutschrank in einer feuchten Kammer.

Hinweis: Für die Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer muss man die Hämolyse in den Komplementkontrollen verfolgen. Die Inkubation wird nur solange fortgesetzt, bis die Wells mit 2 und 1 Komplementeinheiten 100 % Hämolyse zeigen; bei 0,5 und 0,25 Komplementeinheiten darf keine Hämolyse auftreten.

10. Platte entweder 30 min bis 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen oder für 5 min bei $900 \times g$ abzentrifugieren (Erythrozytensedimentation)

11. Auswertung mit Ablese Spiegel

Kontrollsystem und Interpretation der Ergebnisse

Das Ablesen der Reaktionsstärke je Verdünnungsstufe erfolgt nach dem Grad der Hämolyse und der Größe des Erythrozytensedimentes (Knopfbildung) im Vergleich zur Kontrolle des hämolytischen Systems:

100 % Hämolyse	=	negativ	=	0 % Erythrozytensediment
75 % Hämolyse	=	+	=	25 % Erythrozytensediment
50 % Hämolyse	=	++	=	50 % Erythrozytensediment
25 % Hämolyse	=	+++	=	75 % Erythrozytensediment
0 % Hämolyse	=	++++	=	100 % Erythrozytensediment

Bei der Durchführung des Hauptversuches sind jeweils folgende Kontrollansätze mitzuführen:

Kontrolle der antikomplementären Wirkung (Eigenhemmung) jedes Serums (Serumkontrolle)

Serumverdünnung	25 µl (z. B. Serumverdünnung 1 : 5 und 1 : 10 verwenden)
KBR-Puffer	25 µl
Komplement	25 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

Von Eigenhemmung spricht man bei fehlender Hämolyse (mit Erythrozytensediment).

Beim Auftreten von Eigenhemmung empfiehlt sich folgende Vorbehandlung der entsprechenden Seren mit Komplement:

Serum (unverdünnt)	75 µl
Komplement (unverdünnt)	25 µl
30 min bei 37 °C ± 1 °C im Wasserbad inkubieren	
KBR-Puffer	900 µl
30 min bei 58 °C im Wasserbad inkubieren	

Hinweis: Nicht bei allen Seren kann durch diese Vorbehandlung Eigenhemmung vermieden werden. In solchen Fällen muss die Untersuchung mit einem erneut von diesem Tier gewonnenen Serum wiederholt werden.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Antigenkontrolle (AG)

KBR-Puffer	25 µl
Antigen	25 µl
Komplement	25 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

Komplementkontrolle

Für die Komplementkontrolle werden folgende Konzentrationen verwendet: die 2-fache, die einfache, die 0,5-fache und die 0,25-fache Konzentration der in der Komplementauswertung ermittelten Konzentration ($\hat{=}$ Komplementeinheiten von 2; 1; 0,5 und 0,25). Die entsprechenden Verdünnungen können auch auf der Platte durch Überpipettieren von jeweils 25 µl erzeugt werden (siehe 3. Titration des Serums).

KBR-Puffer	25 µl
Antigen	25 µl
Komplementverd.	25 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	bei Komplementeinheiten von 2 und 1 = 100 % Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment bei 0,5 und 0,25 Komplementeinheiten = 0 % Hämolyse (100 % Erythrozytensediment)

Kontrolle des hämolytischen Systems (HS)

KBR-Puffer	75 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	0 % Hämolyse, 100 % Erythrozytensediment

Positives Kontrollserum (pos. KS)

Serumverdünnung	25 µl
Antigen	25 µl
Komplement	25 µl
HS	50 µl
Soll-Ergebnis	Der ermittelte Titer muss dem für das pos. Kontrollserum angegebenen Titer entsprechen.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Negatives Kontrollserum (neg. KS)

Serumverdünnung	25 µl
Antigen	25 µl
Komplement	25 µl
HS	50µl
Soll-Ergebnis	100 %Hämolyse, 0 % Erythrozytensediment

Beispiel für Plattenbelegung

Reihe ↓	Spalte →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Probenverdünnung										Serum- Kontrollen auf Eigen- hemmung	
	Probenbe- zeichnung	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5	1:10
A	a												
B	b												
C	c												
D	d												
E	e												
F	pos. KS												
G	neg. KS												
H	Kontrollen	AG	AG	HS	HS	2	1	0,5	0,25				
						Komplementeinheiten							

Laut **WOAH QIE**-Manual ist ein Ergebnis bei 1 : 10 (++++) als positiv zu betrachten. 1 : 10+ bis 1 : 10+++ gelten als fraglich.

Das negative Serum darf in der Verdünnung 1 : 5 keine Reaktion zeigen.

Das Ergebnis ist umgehend dem zuständigen Veterinäramt zu melden.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Zusammenfassung Kontrollen und Soll-Ergebnisse:

Antigenkontrolle (AG):

enthält alles außer Serum, dafür KBR-Puffer

Soll-Ergebnis: 100 % Hämolyse

Komplementkontrolle:

enthält alles außer Serum, dafür KBR-Puffer

Soll-Ergebnis: 100 % Hämolyse bei 2 und 1 Komplementeinheiten

0 % Hämolyse bei 0,25 und 0,5 Komplementeinheiten

HS-Kontrolle:

enthält alles außer Komplement, Antigen und Serum, dafür KBR-Puffer

Soll-Ergebnis: keine Hämolyse

Kontrollreihe des positiven Kontrollserums:

Soll-Ergebnis: definierter Titer +/- eine Titerstufe

Kontrollreihe des negativen Kontrollserums:

Soll-Ergebnis: 100 % Hämolyse, in jeder Serumverdünnung

Serumkontrolle:

auf Eigenhemmung bzw. antikomplementäre Aktivität (Well 11 und 12)

enthält alles außer Antigen, dafür KBR-Puffer

Soll-Ergebnis: 100 % Hämolyse

Hinweise:

Alternativ können weitere kommerziell verfügbare Reagenzien verwendet werden (z. B. komplettes hämolytisches System der Firma Labor Merk & Kolleg, Ochsenhausen).

Das Nationale Referenzlabor organisiert regelmäßig Ringtests für die KBR. Die durch die Bundesländer ausgewählten staatlichen Untersuchungsämter sind verpflichtet, an diesen Ringtests teilzunehmen. Das Referenzlabor teilt die Ergebnisse den teilnehmenden Labors mit und führt eine Wertung durch. Bei unververtretbaren Abweichungen ist den entsprechenden Landesbehörden darüber Mitteilung zu machen. Die Ursachen für die entstandenen Abweichungen sind gemeinsam mit dem Referenzlabor abzuklären und abzustellen. Der KBR-Ringversuch muss anschließend vom entsprechenden Labor wiederholt werden.

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Bundesland	Untersuchungsämter
Berlin-Brandenburg	Landeslabor Berlin-Brandenburg Abteilung III: Tierseuchen-, Zoonosen-, Infektionsdiagnostik Gerhard-Neumann-Str. 2-3 15236 Frankfurt (Oder) Tel.: 0335 5217-2100 Fax: 0335 5217-2719 E-Mail: poststelle@landeslabor-bbb.de
Hessen	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) Hauptsitz Schubertstr. 60 35392 Gießen Tel.: 0641 4800-555 Fax: 0641 4800-5900 E-Mail: poststelle@lhl.hessen.de
Mecklenburg-Vorpommern	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V) Thierfelder Str. 18/19 18059 Rostock Tel.: 0381 4035-0 Fax: 0381 4001510 E-Mail: poststelle@lallf.mvnet.de
Niedersachsen	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) Veterinärinstitut Hannover Eintrachtweg 17 30173 Hannover Tel.: 0511 28897-0 Fax: 0511 28897-299 E-Mail: poststelle.vi-h@laves.niedersachsen.de
Nordrhein-Westfalen	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper Deutscher Ring 100 47798 Krefeld Tel.: 02151 849-0 Fax: 02151 849-4042 E-Mail: poststelle@cvua-rrw.de

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Bundesland	Untersuchungsämter
Rheinland-Pfalz	Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz Institut für Tierseuchendiagnostik (ITSD) Blücherstr. 34 56073 Koblenz Tel.: 0261 9149-599 Fax: 0261 9149-55574 E-Mail: poststelle.its@lua.rlp.de
Sachsen	Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen (LUA) Sitz Dresden - Standort Leipzig Bahnhofstr. 58-60 04158 Leipzig Tel: 0351 81444900 Fax: 0351 81444920 E-Mail: poststelle@lua.sms.sachsen.de
Sachsen-Anhalt	Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt Fachbereich 4, Veterinärmedizin Haferbreiter Weg 132-135 39576 Stendal Tel.: 03931-631-0 Fax: 03931-212322 E-Mail: poststelle@lav.ms.sachsen-anhalt.de
Schleswig-Holstein	Landeslabor Schleswig-Holstein Geschäftsbereich 2 - Veterinärwesen Max-Eyth-Str. 5 24537 Neumünster Tel.: 04321 904-5 Fax: 04321 904-619 E-Mail: info@lvua-sh.de
Thüringen	Thüringer Landesamt Verbraucherschutz (TLV), Abteilung 5 - Tiergesundheit und Tierschutz Tennstedter Str. 8/9 99947 Bad Langensalza Tel.: 0361 37743-500 Fax: 0361 37743-050 E-Mail: poststelle@tlv.thueringen.de

Lungenseuche der Rinder (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*)

Medium B-Bouillon

2,45 g Heart infusion broth (Difco)

+ 90,0 ml Aqua bidest.

Autoklavieren 20 min bei 121 °C

sterilfiltriert aseptisch hinzugeben:

20,0 ml Pferdeserum

10,0 ml Frischhefeextrakt*, 25%ig

1,2 ml Calf thymus DNA (von Sigma oder Difco), 0,2%ig

1,0 ml Thalliumacetat, 1%ige Lösung

pH-Wert 7,8 einstellen.

Medium B-Agar

3,60 g Heart infusion agar (von Difco)

+ 90,0 ml Aqua bidest.

Autoklavieren 20 min bei 121 °C

nach Abkühlung auf 50 °C sterilfiltriert aseptisch hinzufügen:

20,0 ml Pferdeserum

10,0 ml Frischhefeextrakt*, 25%ig

1,2 ml Calf thymus DNA (von Sigma oder Difco), 0,2%ig

pH-Wert 7,8 einstellen

*Frischhefeextrakt:

250 g frische Bäckerhefe

+ 1000 ml Aqua bidest.

Suspension für 15 min kochen

Zentrifugieren 15 min bei 250 x g

Sterilfiltrieren

zu 10 ml-Mengen abfüllen

Aufbewahrung bei -20 °C (maximal 2 Monate)

Falldefinition - Lungenseuche der Rinder; *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*)

Klinisches Bild

Klinisches Bild der Lungenseuche der Rinder definiert als:

- erst trockener schmerzhafter Husten, später Husten mit schleimigem Auswurf oder mindestens drei der fünf folgenden Kriterien:
- Atembeschwerden mit schleimigem Nasenausfluss
- Niedergeschlagenheit
- Anorexie mit Abmagerung
- schmerzhafte Thoraxperkussion, ventrale Dämpfung bei Schallperkussion (Erguss) sowie Schabege-
räusche bei Auskultation
- charakteristische Haltung: auswärts gestellte Ellbogen, aufgekrümmter Rücken und nach vorn ge-
streckter Kopf; bei Kälbern: geschwollene Gelenke

Inkubationszeit: drei Wochen bis drei Monate (zum Teil auch länger)

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund durch Erregernachweis mit folgenden Methoden:

Direkter Erregernachweis:

- Erregerisolierung
- Genomnachweis direkt aus Probenmaterial oder aus Kulturmaterial (PCR)

Indirekter Nachweis:

- Antikörpernachweis (KBR, kompetitiver ELISA, Immunoblot)

Zusatzinformation

Die KBR ist das vorgeschriebene serologische Verfahren. Alternativ ist laut OIE ein kompetitiver ELISA möglich, der in Deutschland nicht zugelassen ist und nur mit Sondergenehmigung der zuständigen Behörde angewendet werden darf. Der Immunoblot kann wegen hoher Spezifität zur Abklärung fraglicher KBR- und ELISA-Ergebnisse herangezogen werden und wird ausschließlich im NRL für Lungenseuche im FLI Jena durchgeführt.

Epidemiologischer Zusammenhang

Mindestens einer der zwei folgenden Nachweise unter Berücksichtigung der Inkubationszeit:

- Epidemiologischer Zusammenhang mit einer labordiagnostisch nachgewiesenen Infektion durch gemeinsame Expositionsquelle (infiziertes Tier)
- Kontakt mit einem labordiagnostisch nachgewiesenen infizierten Tier oder seinen Ausscheidungen.

Voraussetzung für den Verdacht

- Indirekter Erregernachweis (KBR oder kompetitiver ELISA) oder
- Vorliegen klinischer Symptome in Verbindung mit pathologisch-anatomischen Veränderungen oder
- Vorliegen klinischer Symptome mit einem epidemiologisch ermittelten Kontakt zu einem oder mehreren nachweislich infizierten Tieren (Ansteckungsverdacht)

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:

- Labordiagnostische Bestätigung durch direkten Erregernachweis mittels PCR direkt aus Probenmaterial und/oder aus Kulturmaterial oder
- klinische Symptome in Verbindung mit einem erwiesenen epidemiologischen Kontakt zu einem nachweislich infizierten Tier und indirektem Erregernachweis (KBR oder ELISA)

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung.

- Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz)
- Verordnung (EU) 2016/429 des europäischen Parlaments und des Rates vom 09. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 vom 03. Dezember 2018 über die 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) 2020/689 vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/687 vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der VO (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen