

## Amtliche Methode und Falldefinition

# Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus*, *Goatpox virus*)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Amtliche Methode</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Charakterisierung der Infektion</b> .....	<b>3</b>
1.1 Erreger .....	3
1.2 Klinische Symptomatik .....	3
1.3 Differenzialdiagnose .....	3
1.4 Diagnostische Indikation .....	3
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung .....	3
1.6 Rechtsgrundlagen.....	4
<b>2. Untersuchungsmaterial</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Untersuchungsgang</b> .....	<b>5</b>
3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR .....	5
3.2 Virusisolierung .....	7
3.3 Antikörpernachweis .....	7
<b>Falldefinition - Pockenseuche der Schafe und Ziegen; Capripoxvirus</b> .....	<b>9</b>

## Amtliche Methode

### 1. Charakterisierung der Infektion

#### 1.1 Erreger

Das Schafpockenvirus (Sheeppox Virus; SPPV) und das Ziegenpockenvirus (Goatpox Virus, GTPV) sind genetisch sehr nah verwandt und werden dem Genus *Capripoxvirus* zugeordnet. Dieses Genus gehört zur Subfamilie der *Chordopoxvirinae* innerhalb der Familie *Poxviridae*. Beide Viren unterscheiden sich genetisch und sind auch von dem ebenfalls zu den *Capripoxvirus* gehörendem Lumpy skin disease Virus (LSDV) genetisch differenzierbar. In der Regel werden die drei Virusarten des Genus *Capripoxvirus* in den entsprechenden Wirten nachgewiesen. Wirtsübergreifende Nachweise sind möglich, aber selten und in der Regel nur in gemischten Herden anzutreffen.

##### 1.1.1 Vorkommen

Schaf- und Ziegenpocken kommen in Teilen Afrikas und Asiens, im Mittleren Osten und auf dem indischen Subkontinent vor. In Europa wurde der Erreger bisher nur in südlichen Ländern diagnostiziert.

#### 1.2 Klinische Symptomatik

Das Krankheitsbild ist anfänglich durch Fieber, Speicheln sowie Nasen- und Augenausfluss geprägt. Respiratorische Symptome bereiten den Tieren die größten klinischen Probleme. Innerhalb weniger Tage bilden sich Knötchen, später Papeln und Vesikel im Kopfbereich, in der Genitalregion und am Euter. Das Abheilen der Veränderungen kann bis zu sechs Wochen dauern. Hohe Verluste treten besonders bei Lämmern auf, wenn die Schleimhäute des Verdauungs- und Respirationstraktes durch massive Läsionen in Mitleidenschaft gezogen worden sind und sich sekundäre Komplikationen durch bakterielle Infektionen einstellen.

#### 1.3 Differenzialdiagnose

Die wichtigsten Differenzialdiagnosen der Hautveränderungen werden hervorgerufen durch das Parapockenvirus (Orf-Virus), das Bluetongue-Virus und das Maul-und-Klauenseuche-Virus.

#### 1.4 Diagnostische Indikation

DelVO 2020/689 Artikel 9 (1):

Die zuständige Behörde stuft ein Tier oder eine Gruppe von Tieren als Verdachtsfall einer Infektion mit SPPV/GTPV ein, wenn

## Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus*, *Goatpox virus*)

- a) klinische Untersuchungen, pathologische Untersuchungen oder Laboruntersuchungen ergeben haben, dass klinische Anzeichen, *Post-mortem*-Läsionen oder histologische Befunde für das Vorliegen einer Infektion mit SPPV/GTPV sprechen,
- b) die Ergebnisse einer Diagnosemethode an einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren auf die wahrscheinliche Präsenz des SPPV/GTPV hindeuten oder
- c) ein epidemiologischer Zusammenhang mit einem bestätigten Fall einer Infektion mit SPPV/GTPV festgestellt wurde.

### 1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Nationales Referenzlabor (NRL) für Schaf- und Ziegenpocken, Südufer 10, D-17493 Greifswald-Insel Riems

### 1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“) (AHL)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. 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 der Kommission 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 (DelVO 689/2020)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union
- Tiergesundheitsgesetz in der jeweils gültigen Fassung

## 2. Untersuchungsmaterial

Am besten geeignet für die Virusisolierung und die PCR ist Biopsie-Material aus frischen Hautläsionen. Auch *post mortem* sollten die typischen Hautveränderungen sowie befallene Lymphknoten und Lungengewebe labordiagnostisch analysiert werden. Auch EDTA-Blut, Serum sowie Nasentupfer können insbesondere am lebenden Tier für die Untersuchung auf Virusgenom mittels PCR verwendet werden. Darüber hinaus kann

Serum für serologische Untersuchungen genutzt werden. Das Probenmaterial sollte gekühlt bei +4 °C versendet werden.

### 3. Untersuchungsgang

#### 3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR

Als real-time Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von viraler DNA des Genus *Capripox virus* wird vom FLI ein Protokoll basierend auf der Veröffentlichung von Bowden *et al.* (2008) *Virology* 371: 380-399: "Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats." bzw. Stubbs *et al.* (2012) *J. Virol. Methods* 179(2): 419-22: "Validation of a high-throughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA" empfohlen. Der Assay amplifiziert ein 89 bp-Fragment des P32-Gens. Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Extraktion und Amplifikation wurde dieser Capri-p32-Assay-1 mit einem internen Kontroll-Assay in einer duplex-qPCR kombiniert. Bei den internen Kontrollen handelt es sich einmal um ein universelles internes Kontrollsystem (Hoffmann *et al.*, 2006; vertrieben durch Qiagen Leipzig) basierend auf IC2-DNA und andererseits um die Co-Amplifizierung eines beta-Aktin-Gens (Wernike *et al.*, 2011).

Zur DNA-Extraktion sollte der QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), der PCR Template Preparation Kit (Roche) oder vergleichbare Systeme verwendet werden.

Die Amplifizierung erfolgt auf Basis des QuantiTect Multiplex-PCR Kit no ROX (Qiagen, Art-Nr: #204741, Art-Nr: #204743 oder Art-Nr: #204745) oder des PerfeCTa qPCR ToughMix (VWR Art-Nr: #733-2092, Art-Nr: #733-2090 oder Art-Nr: #733-2091) in 12,5 µl Gesamtvolumen.

Sollte eine andere chemische Basis für die Detektion genutzt werden, muss in Vergleichsexperimenten die Sensitivität und Spezifität der verwendeten Reagenzien gezeigt werden.

Als Kontrollen werden neben DNA-Isolierungskontrolle/n (DIC) eine „No Template“ Kontrolle (NTC) und mindestens eine positive Kontrolle (PC) mitgeführt. Als positive Kontrolle sollte eine gering konzentrierte Capripox-DNA zur Anwendung kommen.

Zu den vorgelegten 10 µl Mastermix werden 2,5 µl DNA-Template pipettiert.

##### 3.1.1 Datenanalyse

###### HEX-Kanal:

Für alle Gewebeproben und die entsprechende DIC sollte die IC mit einem vergleichbaren Threshold-Cycle (Ct) nachweisbar sein. Sind die Ct-Werte für die genannten Proben vorhanden, ist von einer erfolgreichen DNA-Isolierung und PCR auszugehen. Ist kein Ct-Wert für die IC feststellbar und gleichzeitig auch keine Capripox-spezifische Amplifizierung aufgetreten, ist die real-time PCR nicht auswertbar und somit ist die DNA-Isolierung und/oder die PCR zu wiederholen.

Für die NTC (SDW) sollte kein Ct-HEX-Wert feststellbar sein.

## Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus, Goatpox virus*)

### FAM-Kanal:

Für die PC sollte ein Ct-Wert feststellbar sein. Hiermit wird die Funktion des Capripox-Genom-Detektionssystems sichergestellt. Ist für die PC kein Ct-Wert feststellbar, ist die PCR mit einem neuen Capripox-Mix1 und/oder einer neuen PC zu wiederholen.

Für die DIC und die NTC sollte kein Ct-FAM-Wert feststellbar sein.

Wenn alle eingesetzten Kontrollen in richtiger Weise reagieren, ist eine Auswertung der Feldproben-Ansätze möglich.

Eine Capripocken-Verdachtsprobe wird dann als positiv/verdächtig in der PCR gewertet, wenn ein Ct-FAM-Wert für die entsprechende Probe festgestellt wird oder ein signifikanter Anstieg der FAM-Fluoreszenz über das Basislevel festzustellen ist.

### Herstellung der Primer-Sonden-Mixe

#### Capri-p32-Mix-1-MGB: (Original Bowden Assay)

(Bowden *et al.*, Virology 371 (2008) 380-399)

Volumen	Oligo (100 pmol/µl)	Sequenz der Primer/Sonde (5'- 3')
15,0 µl	Capri-P32for	AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA
15,0 µl	Capri-P32-rev	AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA
5,0 µl	Capri-P32-FAM-MGB	FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT-MGB
165,0 µl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200,0 µl	Capri-p32-Mix-1-MGB	

#### Capri-p32-Mix-1-Taq: (alternative TaqMan Sonde):

(Primer: Bowden *et al.*, 2008, Sonde: Dietze *et al.*, 2018)

Volumen	Oligo (100 pmol/µl)	Sequenz der Primer/Sonde (5'- 3')
15,0 µl	Capri-P32for	AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA
15,0 µl	Capri-P32-rev	AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA
5,0 µl	Capri-P32-FAM-Taq	FAM-ATG GAT GGC TCA TAG ATT TCC TGA T-BHQ1
165,0 µl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 µl	Capri-p32-Mix-1-Taq	

## Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus*, *Goatpox virus*)

### beta-Actin-DNA-Mix2-HEX:

(Wernike et al., 2011)

Volumen	Oligo (100 pmol/µl)	Sequenz der Primer/Sonde (5` - 3`)
5,0 µl	ACT2-1030-F	AGC GCA AGT ACT CCG TGT G
5,0 µl	ACT-1135-R	CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T
5,0 µl	ACT-1081-HEX	HEX- TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T -BHQ1
185,0 µl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 µl	beta-Actin-DNA-Mix2-HEX	

### EGFP-Mix 1 (limit 5) HEX

(Hoffmann et al., 2006, J. Virol. Methods 136, 200-9)

Volumen	Oligo (100 pmol/µl)	Sequenz der Primer/Sonde (5` - 3`)
5,0 µl	EGFP1-F	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC
5,0 µl	EGFP2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G
5,0 µl	EGFP-Probe 1	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1
185,0 µl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 µl	EGFP-Mix 1 (limit 5) HEX	

Die Virusspeziesbestimmung erfolgt durch Sequenzierung bestimmter Abschnitte des viralen Genoms oder durch Spezies-spezifische real-time PCR-Systeme.

### 3.2 Virusisolierung

Eine Virusanzucht erfolgt im Fall von Schaf- und Ziegenpocken auf der Zelllinie SFT-R (Schafthymus) Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine CCLV-RIE43.

### 3.3 Antikörpernachweis

Für den Nachweis von SPPV- und GTPV-Antikörpern stehen verschiedene serologische Tests zur Verfügung. Für geringe Probenzahlen können der Serumneutralisationstest sowie der indirekte Immunfluoreszenztest verwendet werden. Beide Verfahren sind am NRL etabliert. Für die Etablierung ist ein Labor der Schutzstufe 3 notwendig.

## Pockenseuche der Schafe und Ziegen (*Sheeppox virus*, *Goatpox virus*)

Für den breiten Einsatz steht ein zugelassener, kommerzieller Capripox-Doppel-Antigen-ELISA der Firma IDvet zur Verfügung, der sich durch hohe Spezifität und Sensitivität auszeichnet. Dieser ELISA ermöglicht die serologische Untersuchung von Proben auch in Laboren ohne Schutzstufe 3.

Eine serologische Unterscheidung von Antikörpern gegen SPPV, GTPV und LSDV ist nicht möglich. Auch können aktuell Impfantikörper nicht von Feldvirusantikörpern unterschieden werden.



## Falldefinition - Pockenseuche der Schafe und Ziegen; Capripoxvirus

### Klinisches Bild

Die echten Pocken der kleinen Wiederkäuer werden vom Schafpockenvirus (SPPV) und dem Ziegenpockenvirus (GTPV) des Genus Capripoxvirus der Familie *Poxviridae* hervorgerufen. Beide sind eng mit dem Lumpy-skin-disease-Virus verwandt. Die Pocken der kleinen Wiederkäuer sind in Südost-Europa, Asien und Afrika verbreitet. Das Virus wird von akut oder klinisch inapparent kranken Tieren ausgeschieden. Je nach Verlaufsform schwankt die Mortalität zwischen 2 % und 50 % bzw. 80 % bei Lämmern. Bei manchen europäischen Schafrassen (Soay) kann eine perakute Infektion ohne das Auftreten typischer Hautläsionen einhergehend mit hoher Letalität vorkommen. Nach initialen Fieberschüben entwickeln sich im Verlauf von fünf Tagen Hauterosionen, die in typische Papeln und Vesikel übergehen und generalisiert besonders an unpigmentierten Hautstellen auftreten; starke Ödeme und Lymphknotenschwellungen treten besonders am Kopf auf. Tiere, die eine Infektion mit den Pocken der kleinen Wiederkäuer überstehen, erwerben eine solide Immunität.

### Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Elektronenmikroskopie
- Virusisolierung aus Biopsiematerial veränderter Gewebe
- Virusgenomnachweis (quantitative PCR)

Indirekter Erregernachweis:

- Antikörperbestimmung (ELISA, SNT, indirekte Immunfluoreszenz)

### Differenzialdiagnose

*Parapoxvirus ovis* (weltweite Verbreitung, Zoonoseerreger)

### Epidemiologischer Zusammenhang

Die Verbreitung von Capripoxvirus erstreckt sich über den gesamten Nahen und Fernen Osten, Asien und Afrika. Einschleppungen nach Europa wurden in den letzten Jahren vor allem in Südosteuropa, meist über die Türkei registriert. Die Empfänglichkeit für Capripoxviren kann abhängig von der Rasse (besonders bei Ziegen) stark variieren. Seit langer Zeit kein Auftreten in der Bundesrepublik Deutschland.

### Voraussetzung für den Verdacht

Entsprechend DelVO 2020/689 Artikel 9 (1):

Die zuständige Behörde stuft ein Tier oder eine Gruppe von Tieren als Verdachtsfall einer Infektion mit SPPV/GTPV ein, wenn

- a) klinische Untersuchungen, pathologische Untersuchungen oder Laboruntersuchungen ergeben haben, dass klinische Anzeichen, *Post-mortem*-Läsionen oder histologische Befunde für das Vorliegen einer Infektion mit SPPV/GTPV sprechen,
- b) die Ergebnisse einer Diagnosemethode an einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren auf die wahrscheinliche Präsenz des SPPV/GTPV hindeuten oder
- c) ein epidemiologischer Zusammenhang mit einem bestätigten Fall einer Infektion mit SPPV/GTPV festgestellt wurde.

### Durch TSN zu übermittelnder Fall

Entsprechend DelVO 2020/689 Artikel 9 (2):

Die zuständige Behörde stuft ein Tier oder eine Gruppe von Tieren als bestätigten Fall einer Infektion mit SPPV/GTPV ein, wenn

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

## Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“) (AHL)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. 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 der Kommission 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) 2020/688 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union
- Tiergesundheitsgesetz in der jeweils aktuellen Fassung