

Amtliche Methode und Falldefinition

Infektion mit dem Virus der Blauzungenkrankheit (Serotypen 1-24)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differenzialdiagnose	3
1.4 Diagnostische Indikation	4
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.6 Rechtsgrundlagen.....	4
2. Untersuchungsmaterial	4
3. Untersuchungsgang	5
3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR	5
3.2 Virusisolierung	5
3.3 Nachweis BTV-spezifischer Antikörper.....	5
Literatur	6
Falldefinition - Blauzungenkrankheit; <i>bluetongue virus</i>	7

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Erreger der Infektion mit dem Virus der Blauzungenkrankheit (Serotypen 1-24) (BTV) ist ein dsRNA Orbivirus aus der Familie *Reoviridae*. Es gehört somit zu den unbehüllten doppelsträngigen RNA-Viren mit einem segmentierten Genom. Die zehn Genomsegmente des Virus kodieren für sieben Struktur- und vier Nichtstruktur-Proteine. Das komplette BTV-Partikel enthält ein Core mit Doppelkapsid, wobei die äußere Schale zwei Proteine (VP2 und VP5) enthält, von denen VP2 die Hauptdeterminante für den Serotyp ist. Neben den BTV-Serotypen 1 bis 24 gibt es mittlerweile mindestens **acht zwölf** weitere Serotypen bzw. Genotypen, die man als atypische BTV bezeichnen kann. Diese atypischen BTV-Serotypen wurden in meist klinisch unauffälligen Schafen und Ziegen detektiert. Es gibt Hinweise, dass diese atypischen BTV der kleinen Wiederkäuer eine zu den BTV-Serotypen 1 bis 24 differente Pathogenese und Transmission aufweisen.

1.2 Klinische Symptomatik

Die Infektion mit BTV ist eine infektiöse, nicht kontagiöse und von Gnitzen übertragene Krankheit der Schafe sowie anderer gehaltener und wildlebender Wiederkäuer. In vielen Gebieten der Welt hat die Krankheit wegen der insektengebundenen Übertragung ein saisonales Auftreten. Alternative bzw. zusätzliche Transmissionsrouten scheint es bei den atypischen BTV zu geben, da hier auch Kontaktübertragung des Virus experimentell festgestellt wurde.

Die typischen klinischen Symptome sind nur beim Schaf anzutreffen, wogegen andere infizierte Wiederkäuer meist einen asymptomatischen Verlauf zeigen. Klinische Symptome sind massive Ödeme und Hämorrhagien mit Fieber und Entzündungen bis hin zu Ulzera der Schleimhäute. Häufig kommt es zu Trächtigkeitsstörungen mit Aborten und Fetopathien, auch durch schwach virulente Serotypen und attenuierte Viren (Impfstoffe). Typisch und namensgebend für die Krankheit ist die intensive Hyperämie und Schwellung der Zunge (Blauzunge/Bluetongue), die aber nicht regelmäßig festgestellt werden kann.

1.3 Differenzialdiagnose

Grundsätzlich gilt, dass auch bei „typischer“ Symptomatik die Diagnose „Infektion mit BTV“ anhand des klinischen Bildes lediglich mit einer Sensitivität von 76 % und einer Spezifität von 72 % gestellt werden kann (Elbers *et al.*, 2008). Als Differenzialdiagnosen kommen in erster Linie alle Zustände in Frage, die zu Ödemen und Erosionen an Schleimhäuten führen sowie solche, die Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte verursachen. Als virale Infektionserreger sind hier zu nennen: MKSV, Rinderpest Virus, Akabane Virus, Border Disease Virus, ORF-Virus, EHDV, Bösaartiges Katarrhalfieber Virus, BVD/MD und BHV-1. Zudem sind auch Photosensibilität, Besnoitiose und Mykotoxikose als Differenzialdiagnosen zu berücksichtigen.

Infektion mit dem Virus der Blauzungenkrankheit (Serotypen 1-24)

1.4 Diagnostische Indikation

Die Infektion mit BTV ist eine gelistete Seuche gemäß Anhang II der Delegierten Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission.

- Untersuchungen im Rahmen eines optionalen Tilgungsprogramms („Kategorie C“)
- Untersuchungen im Rahmen von Verbringungen von Tieren und Zuchtmaterial („Kategorie D“)
- Klinischer oder epidemiologisch begründeter Verdacht im Rahmen einer Überwachung/Abklärungspflicht („Kategorie E“)

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Regionale Untersuchungsämter
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Tel. 038351 7-0

1.6 Rechtsgrundlagen

- 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

2. Untersuchungsmaterial

Das am besten geeignete Untersuchungsmaterial stellt EDTA-Blut dar, da mit diesem Untersuchungsmaterial sowohl der Antikörpernachweis mittels ELISA als auch die real-time RT-PCR durchgeführt werden können. Das EDTA-Blut sollte im gekühlten (+4 °C) Zustand versendet werden. Lagerung über längere Zeit sollte bei -70 °C erfolgen, weil BTV bei -20 °C nicht lange stabil bleibt.

Post mortem sind Milz und Lymphknoten die Organe der Wahl zur Virusisolierung. Der Versand sollte schnellstmöglich bei +4 °C erfolgen.

Für den Antikörpernachweis können EDTA-Blut oder mindestens 500 µl Serum/Plasma eingesendet werden. Darüber hinaus kann auch Milch zum Nachweis von BTV-Antikörpern verwendet werden.

3. Untersuchungsgang

Für den BTV-Genomnachweis und den Nachweis von BTV-Antikörpern stehen zugelassene Diagnostika zur Verfügung, die angewendet werden sollten. Diese *In-vitro*-Diagnostika entsprechen Artikel 6 (1) DelVO 689/2020. Darüber hinaus kann auf nachfolgende BTV-Nachweisverfahren hingewiesen werden. Aktuelle Methoden zur Viruscharakterisierung sollten im NRL-BT nachgefragt werden.

3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR

Für den Nachweis der BTV-Serotypen 1-24 werden Pan-BTV-real-time RT-PCR eingesetzt. Hier gibt es verschiedene vom FLI zugelassene real-time RT-PCR Kits, die angewendet werden sollten. Zur weiteren Charakterisierung/Serotypisierung werden spezifische (real-time) RT-PCR-Systeme angewendet. (Eschbaumer *et al.*, 2011, Maan *et al.*, 2016, Ries *et al.*, 2020).

3.2 Virusisolierung

Routinemäßig erfolgt die Anzucht von BT-Viren aus gerinnungsgehemmtem Blut oder Organen (Milz, Lymphknoten) auf Insektenzellen bzw. BSR/BHK21-Zellen. Auch eine Vermehrung auf Aorten-Endothelzellen und Verozellen ist möglich.

3.3 Nachweis BTV-spezifischer Antikörper

In Deutschland sind kommerzielle cELISA für den BTV-Antikörpernachweis aus Serum und Plasma zugelassen (z. B. VMRD, IDvet, IDEXX). Diese Tests sind aufgrund ihrer einfachen Anwendung, verbunden mit einer hohen Spezifität und Sensitivität die erste Wahl für die Untersuchung auf BTV-Antikörper. Weiterhin ist es möglich, mittels kommerziellen Milch-ELISA BTV-Antikörper auch in der Milch von Rind und Schaf zu detektieren. Auch hierzu steht ein zugelassener ELISA zur Verfügung (ID Screen Blue Tongue Milk Indirect, IDvet). Der Nachweis von Serotyp-spezifischen Antikörpern kann mittels aufwändigem Serumneutralisationstest (SNT) erfolgen. Aufgrund von partiellen Kreuzneutralisationen der Antikörper verschiedener Serotypen sollten hierbei immer mehrere Serotypen vergleichend analysiert werden. Der SNT ist generell nicht sensitiver als die zugelassenen ELISA, was insbesondere bei der Untersuchung von grenzwertigen Antikörperlasten zu nicht eindeutigen Ergebnissen führen kann.

Literatur

- Elbers, A.R.W., Backx, A., Ekker, H.M., van der Spek, A.N., van Rijn, P.A., (2008): Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in The Netherlands. *Vet Micro* 129; 156-162.
- Eschbaumer, M., Wäckerlin, R., Savini, G., Zientara, S., Sailleau, C., Bréard, E., Beer, M., Hoffmann, B., (2011:) Contamination in bluetongue virus challenge experiments. *Vaccine* 29(26); 4299-301
- Hofmann *et al.* (2008): Blauzungenkrankheit erreicht die Schweiz. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 150(2); 49-56
- Maan S, Maan NS, Belaganahalli MN, Potgieter AC, Kumar V, Batra K, Wright IM, Kirkland PD, Mertens PP. (2016) Development and Evaluation of Real Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Bluetongue Virus. *PLoS One.* 2016 Sep 23;11(9):e0163014.
- Ries C, Beer M, Hoffmann B. (2020) BlueTYPE - A low density TaqMan-RT-qPCR array for the identification of all 24 classical Bluetongue virus serotypes. *J Virol Methods.* May 13;282:113881. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113881.

Falldefinition - Infektion mit dem Virus der Blauzungenkrankheit (Serotypen 1-24) (BTV)

Klinisches Bild

Die Infektion mit dem Virus der Blauzungenkrankheit (Serotypen 1-24) ist eine infektiöse, meist von kompetenten Vektoren (Arboviren) ausgehende, Allgemeinerkrankung der Schafe sowie anderer gehaltener und wild lebender Wiederkäuer (gelistete Tierarten und -gruppen i. S. der V 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“)). In vielen Gebieten der Welt hat die Krankheit wegen der insektengebundenen Übertragung und Verbreitung ein saisonales Auftreten. Über infizierte Vektoren kann das Virus via Wind, Fahrzeuge oder Flugzeuge über weite Entfernungen verschleppt werden. Die typischen Symptome sind meist nur beim Schaf anzutreffen, wogegen andere Wiederkäuer (vor allem Rinder) oft asymptomatisch subklinisch infiziert sind. Klinisch auffällig sind beim Schaf massive Ödeme und Hämorrhagien mit Fieber und Entzündungen bis hin zu Ulzera der Schleimhäute. Typisch und namensgebend für die Krankheit ist die intensive Hyperämie und Schwellung der Zunge, die aber nicht immer beobachtet werden kann. Häufig kommt es zu Trächtigkeitsstörungen mit Aborten und Fetopathien auch nach Infektion mit schwach virulenten BTV-Serotypen.

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Erregerisolierung im Brutei oder Zellkultur
- Genomnachweis: RT-PCR (konservierter Genombereich für alle BTV-Serotypen 1 - 24)

Indirekter Nachweis:

- Antikörpernachweis (ELISA, SNT)

Epidemiologischer Zusammenhang

- Epidemiologischer Zusammenhang zu einem Verdachts- oder bestätigten Fall einer Infektion mit BTV
- Evidenz für eine Übertragung der Infektion mit BTV im betreffenden Gebiet (Orientierung: 150 km Radius): Endemiegebiete bzw. Restriktionsgebiete
- Generelles Vorkommen kompetenter Vektoren (z. T. saisonales Auftreten)
- Anwendung von Impfstoffen

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 BTV ein, wenn

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

Durch TSN zu übermittelnder, bestätigter 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 BTV ein, wenn

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

Infektion mit dem Virus der Blauzungenkrankheit (*Serotypen 1-24*)

- 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