

## Amtliche Methode und Falldefinition

# SARS-CoV-2-Infektion bei gehaltenen Tieren

## Inhaltsverzeichnis

<b>Amtliche Methode</b> .....	3
1. Charakterisierung der Infektion .....	3
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 (in der jeweils geltenden Fassung) .....	3
2. Untersuchungsmaterial.....	4
2.1 Vorsichtsmaßnahmen .....	4
2.2 Probenmaterial .....	4
2.3 Zeitpunkt der Probenahme .....	4
2.4 Probenversand .....	4
3. Untersuchungsgang .....	5
3.1 Virusnachweis .....	5
3.2 Antikörpernachweis .....	10
4. Literatur: .....	12
<b>Falldefinition - SARS-CoV-2-Infektion</b> .....	13

## Amtliche Methode

### 1. Charakterisierung der Infektion

#### 1.1 Erreger

Bei dem Erreger der Infektionskrankheit COVID-19 handelt es sich um das neue Coronavirus SARS-CoV-2. Dieser erstmals Ende 2019 in China nachgewiesene Erreger stammt mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einem tierischen Reservoir und ist damit als zoonotischer Erreger anzusehen. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt über Tröpfchen (Aerosole) und Schmierinfektionen. Verschiedene Arten gehaltener Tiere sind empfänglich für eine Infektion mit SARS-CoV-2. Dabei sind Katzen, Hunde, Frettchen und Goldhamster empfänglich für SARS-CoV-2. Schweine, Hühner und Enten sind dagegen nicht empfänglich.

Bei SARS-CoV-2 handelt es sich um ein behülltes Virus mit einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität.

#### 1.2 Klinische Symptomatik

Die Ausprägung klinischer Symptome bei infizierten Tieren reicht vom asymptomatischen Verlauf bis zu schweren Atemwegserkrankungen und Durchfall. Die gegenwärtigen Erkenntnisse zu SARS-CoV-2 zeigen, dass die Empfänglichkeit verschiedener Tierarten sehr unterschiedlich ist.

#### 1.3 Differenzialdiagnose

Alle mit respiratorischen Symptomen und/oder Durchfall einhergehenden Erkrankungen, wobei bei der differenzialdiagnostischen Abklärung epidemiologische Zusammenhänge mitberücksichtigt werden müssen.

#### 1.4 Diagnostische Indikation

Epidemiologischer Zusammenhang mit einer labordiagnostisch bestätigten SARS-CoV-2-Infektion oder mit einem Verdacht auf eine SARS-CoV-2-Infektion oder mit einem COVID-19-Ausbruch bei Mensch oder Tier.

#### 1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungseinrichtungen in den Ländern
- Nationales Referenzlabor (NRL) für SARS-CoV-2 bei gehaltenen Tieren am Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 0383517-0

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

- Dritte Verordnung zur Änderung der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 8. Juli 2020,
- Verordnung über meldepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung

## 2. Untersuchungsmaterial

### 2.1 Vorsichtsmaßnahmen

Da es sich bei SARS-CoV-2 um einen humanpathogenen Erreger handelt, ist während der Probenahme und der Bearbeitung der Proben bei Verdacht auf SARS-CoV-2 für den Probenehmer entsprechende Schutzausrüstung notwendig.

### 2.2 Probenmaterial

#### **Für die virologische Untersuchung**

Oro- oder nasopharyngeale Tupferproben oder, wenn dies nicht möglich ist, Kotproben.

#### **Für die serologische Untersuchung**

Nativblutprobe oder Serum

### 2.3 Zeitpunkt der Probenahme

Bei Auftreten von respiratorischer Symptomatik bis zum Abklingen: Tupferproben aus dem Nasopharynx oder dem hinteren Rachenraum bzw. Kotproben.

Ab einer Woche nach Auftreten von Symptomen: Blutproben (zunächst für einen Nachweis von IgM)

### 2.4 Probenversand

Beim Versand der Proben sind die Transportvorschriften für biologische Stoffe der Kategorie B (UN3373) zu beachten. Tupferproben sollten in Virustransportmedium oder einer vergleichbaren Flüssigkeit versendet werden. Tupfer in einer Gelmatrix sollen nicht verwendet werden.

Blut- und Organproben sollten gekühlt oder gefroren versendet werden.

#### **Im Anschreiben ist anzugeben:**

- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. dienstlicher und eventuell privater Telefon- und Fax-Nummer)
- Was wird eingesandt? (Art des Materials, von welchen Tieren, Anzahl etc.)
- Aus welchem Bestand stammen die Proben?
- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)
- Bemerkungen und weitere Hinweise auf eine mögliche Erregereinschleppung.

### 3. Untersuchungsgang

#### 3.1 Virusnachweis

Der Nachweis von SARS-CoV-2-spezifischen Nukleinsäureabschnitten erfolgt mittels RT-qPCR mit spezifischen Primer/Sonden-Kombinationen. Bei Ct-Werten >35 ist möglicherweise die detektierte Viruslast sehr gering. Es besteht zudem die Gefahr falsch positiver Nachweise durch schwach kontaminierte Reagenzien und unspezifischer Reaktionen. Wird daher bei der ersten (Screening-) RT-qPCR ein Ct-Wert >35 ermittelt, erfolgt eine Bestätigung dieses positiven Befundes mit mindestens einer zweiten (Bestätigungs-) RT-qPCR, deren Zielsequenz sich in einem anderen Bereich des viralen Genoms befindet. Als RT-qPCR wird eine Kombination aus der von Corman *et al.* 2020 beschriebenen E\_Sarbeco RT-qPCR mit der Zielsequenz im E-Protein-Gen und der vom Institut Pasteur entwickelten IP4 RT-qPCR mit einer Zielsequenz im Gen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) empfohlen. Die Verwendung von kommerziell erhältlichen RT-qPCR Kits ist ebenfalls möglich.

Der Virusnachweis lässt sich in gepoolten Proben mit einer Poolgröße von bis zu fünf Einzelproben bei nur sehr geringen Sensitivitätseinbußen gut durchführen (Wernike *et al.* 2020; Abdalhamid *et al.* 2020). Dieses Vorgehen wird daher bei sehr großen Probenmengen und zu erwartender geringer Prävalenz empfohlen. Positive Poolproben müssen auf Einzelprobenbasis bestätigt werden. Hierdurch wird auch die Gefahr der Detektion falsch positiver Proben verringert.

##### 3.1.1 RT-qPCR zum Nachweis des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2

###### 3.1.1.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung viraler RNA eignen sich kommerziell erhältliche Kits für die manuelle oder automatisierte Extraktion gemäß den entsprechenden Herstellervorschriften. Zum Nachweis der erfolgreichen RNA-Isolierung kann vor der Isolierung eine heterologe RNA-Isolierungskontrolle (IC2, MS2 oder Ähnliches) zugesetzt werden. Im empfohlenen Standardprotokoll der beiden nachfolgend beschriebenen in-house RT-PCR-Verfahren dient jedoch das Housekeeping-Gen beta-Aktin als Kontrolle für a) einen erfolgreichen Abstrich, b) eine erfolgreiche RNA-Isolierung und c) eine erfolgreich durchgeführte RT-qPCR-Amplifikation.

###### 3.1.1.2 RT-qPCR zum Nachweis des E-Gens

Der Nachweis SARS-CoV-2-spezifischer Nukleinsäuren im E-Gen erfolgt mittels Primer/Sonden, die von der Charité empfohlen werden (Corman *et al.* 2020):

Empfohlene Primer:

E\_Sarbeco\_F1: 5'–ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT-3' (Forward)

E\_Sarbeco\_R2: 5'-ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A-3' (Reverse)

Empfohlene Sonde:

E\_Sarbeco\_P1: 5'-FAM-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-BBQ-3'

## SARS-CoV-2 Infektion bei gehaltenen Tieren

Die empfohlene Primer/Sonden-Kombination weist einen Abschnitt innerhalb der für das E-Protein codierenden RNA nach: Nukleotide 26269 - 26381 der als Referenzsequenz genutzten genomischen Sequenz des Virus „*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1*“ mit der Genbank-Nummer MN908947.3 (Wu *et al.* 2020). Zur Überprüfung einer erfolgreichen RNA-Extraktion kann vor der Extraktion heterologe Kontroll-RNA (z. B. IC2-RNA (Hoffmann *et al.* 2006) oder MS2-RNA (Ninove *et al.* 2011)) zugegeben werden<sup>1</sup>, routinemäßig wird jedoch das *Housekeeping*-Gen beta-Aktin in den jeweiligen Ansätzen mit Hilfe spezifischer Primer nachgewiesen.

Die hierfür verwendeten Primer und Sonden (Toussaint *et al.* 2007) sind:

Bezeichnung	Sequenz	Lokalisation (AY141970)
ACT-1005-F	5'-CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C-3'	1005 - 1029
ACT-1135-R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T-3'	1114 - 1135
ACT-1081-HEX	5'-HEX-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-BHQ1-3'	1081 - 1105

Der Aktin-Nachweis dient der Bestätigung eines erfolgten Abstrichs und der erfolgreichen RNA-Isolierung. Alternativ zu dem hier angegebenen  $\beta$ -Aktin-Mix2-HEX kann auch der unten beschriebene  $\beta$ -Aktin-Mix4-HEX auf die gleiche Weise und ohne Einschränkung verwendet werden.

Zur erleichterten Herstellung des Mastermix werden Vormischungen der spezifischen Primer/Sonden-Kombinationen hergestellt (Ausgangskonzentration der Primer/Sonden: 100  $\mu$ M):

### E\_Sarbeco-Mix-FAM:

10,0 $\mu$ l	E_Sarbeco_F1
10,0 $\mu$ l	E_Sarbeco_R2
5,0 $\mu$ l	E_Sarbeco_P1
175,0 $\mu$ l	0,1 x TE (pH 8,0)
200 $\mu$ l	Primer/Sonden-Mix

### $\beta$ -Aktin-Mix2-HEX:

5,0 $\mu$ l	ACT-1005-F
5,0 $\mu$ l	ACT-1135-R
5,0 $\mu$ l	ACT-1081-HEX
185,0 $\mu$ l	0,1 x TE (pH 8,0)
200 $\mu$ l	Primer/Sonden-Mix

### $\beta$ -Aktin-Mix4-HEX

5,0 $\mu$ l	ACT-1030-F
5,0 $\mu$ l	ACT-1135-R
5,0 $\mu$ l	ACT-1081-HEX
185,0 $\mu$ l	0,1 x TE (pH 8,0)
200 $\mu$ l	Primer/Sonden-Mix

<sup>1</sup> Sequenzen für Primer und Sonden zum Nachweis von IC2 bzw. MS2 sind nicht Teil der Methodensammlung.

Empfohlener Mastermix (pro Ansatz):

Amplifikations-Kit: SuperScript III One Step RT-PCR Kit with Platinum Taq- Polymerase	Ansatz mit Primern für beta-Aktin als Extraktionskontrolle und Referenz
RNase freies Wasser	2,1 µl
50 mM MgSO <sub>4</sub>	0,4 µl
2x Reaktions-Mix	12,5 µl
E_Sarbeco-Mix-FAM	2,0 µl
B-Actin-Mix2-HEX	2,0 µl
SuperScript III /Platinum Taq-Mix	1,0 µl

20,0 µl

5,0 µl

vorlegen in Reaktionsgefäß, anschließend  
RNA Template zugeben

Das verwendete Temperaturprofil der RT-qPCR weicht nach Optimierungsschritten von dem in der Publikation empfohlenen Profil für den LightCycler ab:

45 °C 10 Min.

94 °C 5 Min.

42 Zyklen:

94 °C 15 Sek.

57 °C 20 Sek

72 °C 30 Sek. (Fluoreszenzmessung)

Bei jedem Lauf werden mindestens die folgenden Kontrollen mitgeführt (Positivkontrolle = isolierte RNA mit bekanntem Ct-Wert, Negativkontrolle = RNA-Isolierung aus Material, das keine SARS-CoV-2-spezifische RNA enthält, NTC = No template control = Puffer oder Wasser)

Beim Einsatz alternativer PCR-Reagenzien sind diese laborintern auf ihre Eignung zu prüfen.

### 3.1.1.3 RT-qPCR zum Nachweis des RdRp-Gens

Der Nachweis SARS-CoV-2-spezifischer Nukleinsäuren im RdRp-Gen erfolgt mittels Primer/Sonden, die das Institut Pasteur empfiehlt.

Empfohlene Primer:

SARS2-IP4-14059F: 5'–GGT AAC TGG TAT GAT TTC G -3' (Forward)

SARS2-IP4-14146R: 5'-CTG GTC AAG GTT AAT ATA GG -3' (Reverse)

Empfohlene Sonde:

SARS2-IP4-14084: FAM: 5'-FAM- TCA TAC AAA CCA CGC CAG G -BHQ-3'

Die Primer/Sonden-Kombination weist einen Abschnitt innerhalb der für das RdRp-Protein codierenden RNA nach: Nukleotide 14080 - 14186 der als Referenzsequenz genutzten genomischen Sequenz des Virus „Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1“ mit der

## SARS-CoV-2 Infektion bei gehaltenen Tieren

Genbank-Nummer MN908947.3 (Wu *et al.* 2020). Zur Überprüfung einer erfolgreichen RNA-Extraktion kann vor der Extraktion heterologe Kontroll-RNA (z. B. IC2-RNA oder MS2-RNA) zugegeben werden<sup>2</sup>, routinemäßig wird jedoch das *Housekeeping*-Gen beta-Aktin in den jeweiligen Ansätzen mit Hilfe spezifischer Primer (Wernike *et al.* 2012) nachgewiesen. Die hierfür verwendeten Primer und Sonde sind:

Bezeichnung	Sequenz	Lokalisation (AY141970)
ACT-1030-F	5'-AGC GCA AGT ACT CCG TGT G -3'	1030 - 1047
ACT-1135-R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T-3'	1114 - 1135
ACT-1081-HEX	5'-HEX-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-BHQ1-3'	1081 - 1105

Der Aktin-Nachweis mit dem Vorwärtsprimer ACT-1030-F weist neben genomischer DNA auch RNA nach und dient der Bestätigung eines erfolgten Abstrichs sowie der erfolgreichen RNA-Isolierung.

Zur erleichterten Herstellung des Mastermix werden Vormischungen der spezifischen Primer/Sonden-Kombinationen hergestellt (Ausgangskonzentration der Primer/Sonden: 100 µM):

### SARS-2-IP4-Mix-FAM:

15,0 µl	SARS2-IP4-14059F
15,0 µl	SARS2-IP4-14146R
5,0 µl	SARS2-IP4-14084
165,0 µl	0,1 x TE (pH 8,0)
200 µl	Primer/Sonden-Mix

### B-Aktin-Mix4-HEX:

5,0 µl	ACT-1030-F
5,0 µl	ACT-1135-R
5,0 µl	ACT-1081-HEX
185,0 µl	0,1 x TE (pH 8,0)
200 µl	Primer/Sonden-Mix

<sup>2</sup> Sequenzen für Primer und Sonden zum Nachweis von IC2 bzw. MS2 sind nicht Teil dieser Arbeitsanweisung.



Empfohlener Mastermix (pro Ansatz):

Amplifikations-Kit: AgPath-ID™ One-Step RT-qPCR Reagents	Ansatz mit Primern für beta-Aktin als Extraktionskontrolle und Referenz
RNase free water	1,25 µl
2x RT-PCR buffer	6,25 µl
25x RT-PCR enzyme mix	0,5 µl
SARS-2-IP4-Mix-FAM	1,0 µl
β-Actin-Mix4-HEX	1,0 µl

10,0 µl

vorlegen in Reaktionsgefäß,  
anschließend

2,5 µl

RNA Template zugeben

Für diese RT-qPCR wird das folgende Temperaturprofil verwendet:

45 °C 10 Min.

95 °C 10 Min.

42 Zyklen:

95 °C 15 Sek.

57 °C 20 Sek.

72 °C 30 Sek. (Fluoreszenzmessung)

Bei jedem Lauf werden mindestens die folgenden Kontrollen mitgeführt (Positivkontrolle = isolierte RNA mit bekanntem Ct-Wert, Negativkontrolle = RNA-Isolierung aus Material, das keine SARS-CoV-2-spezifische RNA enthält, NTC = No template control = Puffer oder Wasser)

Beim Einsatz alternativer PCR-Reagenzien sind diese laborintern auf ihre Eignung zu prüfen.

#### 3.1.1.4 Auswertung der PCRs

Zur Auswertung der PCRs wird der Ct-Wert der Amplifikation des Kontrollgens (sofern im Reaktionsansatz vorhanden) sowie der SARS-CoV-2-spezifischen Amplifikation bestimmt. Diese Bestimmung erfolgt je nach Auswertesoftware durch einen automatischen Algorithmus oder einen definierbaren Schwellenwert:

- NTC und Negativkontrolle dürfen keinen Ct-Wert aufweisen.
- Die Positivkontrolle liegt im definierten Ct-Wertbereich.
- Für alle Feldproben sollte die interne Kontrolle (heterolog oder beta-Aktin-basiert) nachweisbar sein. Ist kein Ct-Wert für die interne Kontrolle feststellbar und gleichzeitig auch keine SARS-CoV-2-spezifische Amplifizierung aufgetreten, ist die RT-qPCR nicht auswertbar und somit die RNA-Isolierung und/oder die RT-PCR zu wiederholen.

## SARS-CoV-2 Infektion bei gehaltenen Tieren

Liegen die Ct-Werte der Kontrollen in den angegebenen Bereichen, ist die RT-qPCR auswertbar. Wurde bei der RT-qPCR eine Standardverdünnungsreihe mit bekannter Kopienzahl mitgeführt, so kann mittels dieser Standardgerade die Kopienzahl der RNA in der Ursprungs-RNA-Suspension bestimmt werden.

Die Anzucht von Virus aus Probenmaterial mit anschließender Sequenzierung ist ebenfalls eine geeignete Methode eine Infektion mit SARS-CoV-2 nachzuweisen. Der Anzuchtversuch sowie die Isolierung des Virus müssen dabei unter der biologischen Schutzstufe 3 durchgeführt werden. Es ist weiterhin zu beachten, dass die Anzucht bei niedrig belasteten Proben meist nicht möglich ist.

### 3.2 Antikörpernachweis

Der Nachweis spezifischer Antikörper gegen das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 kann durch zugelassene ELISA oder Point of Care-Testsysteme gemäß den Herstelleranweisungen erfolgen. Die Bestätigung erfolgt durch den Serumneutralisationstest (z. B. SNT, PRNT, Surrogatformate) oder den indirekten Immunfluoreszenztest.

#### 3.2.1 Indirekter Immunfluoreszenztest

##### 3.2.1.1 Prinzip

Der Test basiert auf einer Bindung von SARS-CoV-2-Antikörpern in Seren an eine virusantigenhaltige Matrix (= virusinfizierte Zellkultur). Die Bindung wird mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem anti-Spezies-Antikörper (Konjugat) visualisiert.

##### 3.2.1.2 Testdurchführung

Der indirekte Immunfluoreszenztest kann mit Seren oder Plasmaproben durchgeführt werden. Eine Inaktivierung ist nicht erforderlich.

##### *Herstellung der virusinfizierten Testmatrix*

Durch Vermehrung von SARS-CoV-2 in Vero 76-Zellen oder in einer anderen empfänglichen Vero-Sublinie erfolgt die Herstellung eines Masterstocks, welcher aliquotiert und titriert wird.

Eine Vero-ATV Zellsuspension wird in einem Verhältnis von 1:20 in 96-well Gewebekulturplatten zu je 100 µl/Well ausplattiert und 24 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Schrank (2,5 bzw. 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Am folgenden Tag werden die senkrechten Spalten 2, 4, 6, 8, 10 und 12 mit jeweils 10<sup>2,5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml Virus (100 µl/Well) inokuliert.

Die infizierten Platten inkubieren für 24 Stunden bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Bedingungen. Danach werden die Überstände abgesaugt, 1x mit PBS- gewaschen und 100 µl/Well mit 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert.

Die Platten 1x mit PBS- waschen. Ein Konservieren der Platten ist nach diesem Schritt bei Kühlschranktemperatur möglich. Dafür müssen die Zellen mit 100 µl PBS- überschichtet werden.

### *Durchführung der Immunfluoreszenzreaktion*

PBS- von den Platten absaugen und mit 50 µl/Well 0,5 % Triton (in PBS verdünnt) für 10 min permeabilisieren. Anschließend 2x mit TBST waschen.

Seren werden in einer Verdünnung von 1:8 bis 1:1024 in 2-er Schritten getestet. Dazu werden jeweils 50 µl der Verdünnung in ein infiziertes Well und ein Kontrollwell gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST erfolgt eine Inkubation mit 50 µl/Well verdünntem Fluoreszenzfarbstoff-markierten anti-Spezies-Konjugat wiederum für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend 2x mit TBST waschen und mit 50 µl/Well Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO) überschichten. Die Auswertung erfolgt im inversen Fluoreszenzmikroskop.

### *Reagenzien*

Waschpuffer: TBST - SIGMA, Bestellnummer T-9039

PBS · Stammlösung (10-fach): 80 g NaCl  
2 g KCl  
11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
auf 1000 ml Aqua dest.

PBS · Gebrauchslösung: 100 ml der Stammlösung auf 900 ml Aqua dest.

anti-Spezies-Antikörper (Konjugat): abhängig von zu untersuchender Probe

Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO) - SIGMA, Bestellnummer D 2522

2,5 g 1,4-Diazobicyclo[2,2,2]-octan (DABCO)  
in 90 ml Glycerol lösen (37 °C, Wasserbad)  
+ 10 ml PBS  
pH mit HCl konz. auf 8,6 einstellen (wenige Tropfen)  
mit 100 ml Aqua dest. verdünnen

### 4. Literatur

- Abdalhamid, B., C. R. Bilder, E. L. McCutchen, S. H. Hinrichs, S. A. Koepsell and P. C. Iwen (2020). "Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing Resources." American Journal of Clinical Pathology 153(6): 715-718.
- Corman, V. M., O. Landt, M. Kaiser, R. Molenkamp, A. Meijer, D. K. W. Chu, T. Bleicker, S. Brunink, J. Schneider, M. L. Schmidt, D. Mulders, B. L. Haagmans, B. van der Veer, S. van den Brink, L. Wijsman, G. Goderski, J. L. Romette, J. Ellis, M. Zambon, M. Peiris, H. Goossens, C. Reusken, M. P. G. Koopmans and C. Drosten (2020). "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR." Euro Surveill 25(3).
- Hoffmann, B., K. Depner, H. Schirrmeier and M. Beer (2006). "A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses." J Virol Methods 136(1-2): 200-209.
- Ninove, L., A. Nougairede, C. Gazin, L. Thirion, I. Delogu, C. Zandotti, R. N. Charrel and X. De Lamballerie (2011). "RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests." PLoS One 6(2): e16142.
- Tan, C. W., W. N. Chia, X. Qin, P. Liu, M. I. C. Chen, C. Tiu, Z. Hu, V. C.-W. Chen, B. E. Young, W. R. Sia, Y.-J. Tan, R. Foo, Y. Yi, D. C. Lye, D. E. Anderson and L.-F. Wang (2020). "A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (sVNT) based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike (RBD) protein-protein interaction", Nature Biotechnology 38(9): 1073-1078
- Toussaint, J. F., C. Sailleau, E. Breard, S. Zientara and K. De Clercq (2007). "Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments." J Virol Methods 140(1-2): 115-123.
- Wernike, K., B. Hoffmann, D. Kalthoff, P. König and M. Beer (2011). "Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1." J Virol Methods 174(1-2): 77-84.
- Wu, F., S. Zhao, B. Yu, Y.-M. Chen, W. Wang, Z.-G. Song, Y. Hu, Z.-W. Tao, J.-H. Tian, Y.-Y. Pei, M.-L. Yuan, Y.-L. Zhang, F.-H. Dai, Y. Liu, Q.-M. Wang, J.-J. Zheng, L. Xu, E. C. Holmes and Y.-Z. Zhang (2020). "A new coronavirus associated with human respiratory disease in China." Nature.

## Falldefinition - SARS-CoV-2-Infektion

### Klinisches Bild

Die Ausprägung klinischer Symptome bei infizierten Tieren reicht vom asymptomatischen Verlauf bis zu schweren Atemwegserkrankungen und Durchfall. Die gegenwärtigen Erkenntnisse zu SARS-CoV-2 zeigen, dass die Empfänglichkeit verschiedener Tierarten sehr unterschiedlich ist.

### Differenzialdiagnose

Erkrankungen mit respiratorischer Symptomatik und Durchfall.

### Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Genomnachweis mittels RT-qPCR
- Virusisolierung

Für den Erregernachweis eignen sich Abstriche von der Rachen- und Nasenschleimhaut oder, falls diese nicht genommen werden können, Kotproben.

Indirekter Nachweis:

- spezifische Neutralisation durch Antikörper (SNT)
- Enzymimmuntests (ELISAs, LFDs)
- Indirekter Immunfluoreszenztest

Die Bestätigung von SARS-CoV-2-Fällen bei Tieren erfolgt am FLI.

### Epidemiologischer Zusammenhang

Epidemiologischer Zusammenhang mit einer labordiagnostisch bestätigten SARS-CoV-2-Infektion oder mit einem Verdacht auf eine SARS-CoV-2-Infektion oder mit einem COVID-19-Ausbruch bei Mensch oder Tier.

### Zusatzinformation

Verdachtsproben sollten unter entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen (inkl. persönlicher Schutzausrüstung) behandelt werden. Für den Versand von Probenmaterial sind die einschlägigen Vorschriften zu beachten.

### Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung einer SARS-CoV-2-Infektion oder eines Ausbruchs:

- Nachweis von Virus oder viralem Genom bei einem Tier
- Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen SARS-CoV-2

### Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Dritte Verordnung zur Änderung der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 8. Juli 2020
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils geltenden Fassung