

Amtliche Methode und Falldefinition

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Amtliche Methode | 3 |
| 1. Charakterisierung der Infektion | 3 |
| 1.1 Erreger | 3 |
| 1.2 Klinische Symptomatik | 3 |
| 1.3 Differentialdiagnostik..... | 3 |
| 1.4 Diagnostische Indikation | 3 |
| 1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung | 4 |
| 1.6 Rechtsgrundlagen..... | 4 |
| 2. Untersuchungsmaterial..... | 4 |
| 3. Untersuchungsgang | 5 |
| 3.1 Anzucht..... | 5 |
| 3.2 PCR..... | 5 |
| 3.3 Antikörpernachweis | 5 |
| 3.4 Agglutination | 6 |
| 3.5 Serologie | 6 |
| 3.6 Identifikation von Bakterienisolaten mit MALDI-TOF MS | 6 |
| 3.7 Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik | 6 |
| 3.8 Antibiotikaresistenz-Testung | 7 |
| Anhang..... | 10 |
| Falldefinition - Tularämie (Hasenpest, Nagerpest); <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> (syn. <i>nearctica</i> , Biovar Typ A); subsp. <i>holarctica</i> (syn. <i>Palaearctica</i> , Biovar Typ B), subsp. <i>novicida</i> , Biovar Typ C; <i>F. philomiragia</i> | 20 |

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Francisella (F.) tularensis ist ein kleines (0,2 - 0,5-µm x 0,7 - 1,0 µm), gramnegatives Stäbchen, das weder Sporen noch Flagellen bildet und fakultativ intrazellulär wachsen kann. In Deutschland kommt nur die Subspezies *F. tularensis holarctica* vor, die virulentere Subspezies *F. tularensis tularensis* ist ausschließlich in Nordamerika endemisch.

Viele Wildtiere können an Tularämie erkranken bzw. ein Reservoir sein, wobei Ausbrüche meist mit vermehrtem Auftreten von diversen Nagetieren assoziiert waren. Sehr empfänglich für eine Infektion sind Feldhasen und Wildkaninchen. In der Literatur wurden auch Einzelfälle von Infektionen bei Hunden und Katzen beschrieben, allerdings ist die Erkrankung für Haus- und Nutztiere kaum relevant.

1.2 Klinische Symptomatik

Bei Feldhasen und Kaninchen verläuft die Tularämie häufig als akute Sepsis und führt in wenigen Tagen zum Tod. Chronische Infektionen sind die Ausnahme, diese Tiere können aber die Erreger ausscheiden und eine Infektionsquelle sein. Kranke Hasen sind auffallend apathisch. Sie laufen schwankend und verlieren häufig die natürliche Scheu.

Typische pathologische Befunde sind eine deutliche Milzvergrößerung, ausgeprägte Lymphknotenschwellungen und Verkäsungen sowie gelblich-graue miliare Abszesse, manchmal auch hämorrhagische Veränderungen in Leber, Lunge, Milz und Niere. Bei fulminanten Krankheitsverläufen können diese Herde jedoch fehlen.

Den Steckbrief zur Tularämie des Friedrich-Loeffler-Instituts finden Sie hier:

https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00023755/Steckbrief_Tularaemie_2019_10_21.pdf

1.3 Differenzialdiagnose

Das Krankheitsbild kann mit Pseudotuberkulose und Pasteurellose verwechselt werden.

1.4 Diagnostische Indikation

Verendete Feldhasen und Wildkaninchen sollten auf Tularämie untersucht werden.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Staatliche Veterinäruntersuchungsämter
- Nationales Referenzlabor für Tularämie, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Naumburger Straße 96 a, 07743 Jena, Tel. 03641 804-2100.

Homepage: <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-bakterielle-infektionen-und-zoonosen-ibiz/referenzlabore/nrl-fuer-tularaemie/>

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

Bei Tieren besteht gemäß der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten (in der aktuell gültigen Fassung) Meldepflicht bei Auftreten der Krankheit oder Nachweis des Erregers.

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten

2. Untersuchungsmaterial

Für die Anzucht von *F. tularensis* eignen sich Gewebeproben von Tieren, die möglichst nicht mehrfach bedingt durch die Witterung, den Transport (Spätherbst) oder im Labor eingefroren bzw. aufgetaut wurden.

Untersuchungsmaterial Erregernachweis:

Die Anzucht kann aus Milz, Leber, Lunge, Niere oder anderen Organen erfolgen.

Untersuchungsmaterial Antikörpernachweis:

Serum (z. B. zum Nachweis der Serokonversion von Wildschweinen und Füchsen in Endemiegebieten).

Beförderung der Proben:

Das Gewebe ist einige Tage bei 2 bis 8 °C gekühlt haltbar, ansonsten soll die Lagerung möglichst bei -80 °C erfolgen.

Den entsprechenden Teil des **Präanalytikhandbuches** finden Sie hier: <https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IBIZ/ALA-Tularaemie-20150306.pdf>

Bitte füllen Sie einen **Einsendebogen an das NRL für Tularämie** aus, wenn Sie Proben an das FLI senden:

<https://fms.fli.de/lip/form/display.do?%24context=48FC9ADA3071DEBB2F3B>

3. Untersuchungsgang

3.1 Anzucht

Francisella tularensis ist ein anspruchsvolles Bakterium, das langsam wächst und leicht durch Begleitkeime überwuchert werden kann. Deshalb wird in der Regel ein Herz-Zystein-Agar (Cystein-Heart-Agar; CHA) mit Antibiotikazusätzen verwendet (siehe Anhang 1). Alternativ kann ein modifizierter Martin-Lewis-Agar eingesetzt werden, der dem Thayer-Martin-Medium mit Antibiotikazusätzen entspricht (z. B. BD Biosciences Artikel Nr. 254029).

Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und 5 % CO₂ für mindestens 48 Stunden (bis 10 Tage). Die Kolonien sind auf CHA-Agar klein, grau-weiß bis grünlich, 1 - 2 mm im Durchmesser, durchscheinend, flach, glatt begrenzt, glänzend und schnell konfluierend. Eine schwache Hämolyse kann sichtbar sein. Auf MacConkey Agar wächst *F. tularensis* nicht.

F. tularensis holarctica ist Oxidase-negativ, schwach Katalase-positiv, bildet Betalaktamasen und ist somit Cefinase-positiv (BD Heidelberg, BD Cefinase Testblättchen Produkt Nr. 231650), ist Urease-negativ und fermentiert Glucose und Maltose, aber weder Lactose noch Sucrose. In kommerziellen biochemischen Differenzierungssystemen muss mit Fehlidentifikationen gerechnet werden.

3.2 PCR

Für den Nachweis von *F. tularensis* eignen sich real-time PCR-Systeme z. B. für die Zielgene *tul4*, *ISFtu2* und *23kDa* (Versage 2003, Splettstösser 2005, Matero 2010) (siehe Anhang 2). Eine Differenzierung zwischen *F. tularensis holarctica* und anderen Subspezies kann mit konventionellen PCR-Systemen in einem Duplex-Ansatz erfolgen und wird im Rahmen der weiterführenden Diagnostik routinemäßig am NRL durchgeführt (Johansson 2000) (siehe Anhang 2). Für den spezifischen Nachweis des potenziellen B-Agens *F. tularensis tularensis* steht eine spezifische LightCycler™ PCR zur Verfügung (Tomaso 2007).

Nach derzeitigem Kenntnisstand können alle in Deutschland vorkommenden *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*-Stämme zuverlässig nachgewiesen werden.

Dennoch sind - wie bei jeder PCR - die Primer und Sonden in regelmäßigen Abständen mittels geeigneter Datenbanken (z. B. NCBI BLAST) auf Spezifität zu prüfen.

3.3 Antikörpernachweis

Antikörper im Blutserum werden mittels Serumlangsamagglutination (SLA) im Mikroverfahren bestimmt (siehe Anhang 3). Die Spezifitätskontrolle der Ergebnisse sollte mit Brucella-Antigen erfolgen.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

3.4 Agglutination

Eine rasche Identifikation von Kolonien kann mittels Agglutination erfolgen (BD, Heidelberg, *Francisella tularensis* Antiserum Produkt Nr. 240939).

3.5 Serologie

Der Nachweis spezifischer Antikörper gegen *F. tularensis spp.* ist zehn bis 14 Tage nach der Infektion im Blutserum möglich. Titer von ≥ 160 oder ein vierfacher Titeranstieg sprechen für eine aktuelle Infektion und sind diagnostisch verwertbar, dagegen können Antikörper mit einem Titer von 20 bis 80 auch über längere Zeit persistieren.

3.6 Identifikation von Bakterienisolaten mit MALDI-TOF MS

Francisella tularensis subsp. *holarctica*-Isolate können mit MALDI-TOF MS identifiziert werden, wenn entsprechende Referenzspektren in der Datenbank vorhanden sind. Die Präparation erfolgt mit dem Ethanol-Extraktionsverfahren (entsprechend dem Protokoll der Fa. Bruker Daltonics). Nach 20 min in Ethanol sind die Francisellen abgetötet und die übliche Präparation kann gefahrlos erfolgen. Das Picken und das direkte Auftragen der Kolonien auf das Target werden nicht empfohlen.

3.7 Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik

Gesamtgenomsequenzierung mit anschließender bioinformatischer Datenanalyse ist in vielen Ländern bereits Standard bei der isolatbasierten hochauflösenden Typisierung und bei Ausbruchsanalysen von *Francisellen*. Während die Sequenzierung mittels Verfahren der zweiten Generation (next generation sequencing) etabliert ist, befinden sich Verfahren der dritten Generation in der Validierungsphase. Für Sequenzierung und Datenanalyse sollte der Leitfaden ISO 23418 in der jeweiligen aktuellen Fassung beachtet werden. DNS-Isolation und Erstellung von Libraries sollte nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Die Datenanalyse beginnt mit einer Qualitätskontrolle. Dabei sollten 70 % der Basen einer Probe einen Qualitätswert (Phred Score) von mindestens 30 aufweisen. Quantitativ sollte eine Coverage von mindestens 30 angestrebt werden, wobei möglichst 70 % der Reads taxonomisch dem Genus *Francisella* zugeordnet werden sollten. In der Datenanalyse folgt nun meist die Assemblierung der Reads zur Vorhersage von Contigs. Die assemblierten Genome sollten eine Größe von 1,7 - 1,9 mB und einen N50-Wert von 15 kB aufweisen. Die grobe Typisierung auf Grundlage von assemblierten Genomen erfolgt mit dem Programm CanSNPer (Lärkeryd *et al.*, 2014) und basiert auf vordefinierten kanonischen Einzelnukleotidänderungen (SNPs). Hochauflösende Typisierung kann einerseits durch die Bestimmung von Einzelnukleotidänderungen (SNPs) durchgeführt werden. Andererseits haben sich Verfahren basierend auf Kerngenom-MLST etabliert. Hier bietet sich die kostenfreie Software ChewBBACA (Silva *et al.*, 2018) oder die lizenzierte Software Ridom SeqSphere+ (Jünemann *et al.*, 2013) an.

Eine Linux-basierte Pipeline zur automatischen Analyse von Gesamtgenomdaten *Francisella tularensis* ist kostenfrei verfügbar: https://gitlab.com/FLI_Bioinfo/WGSBAC

3.8 Antibiotikaresistenz-Testung

§ 12d TÄHAV legt fest, dass die Empfindlichkeit eines bakteriellen Isolats gegen antibiotisch wirksame Substanzen nach national oder international anerkannten Verfahren zu erfolgen hat, falls diese verfügbar sind. Anerkannte Standards zur Durchführung der Empfindlichkeitstestung stellen sicher, dass die für einzelne Substanzen ermittelten Konzentrationswerte, bei denen Wachstumshemmung auftritt, zwischen Laboren vergleichbare Resultate ergeben.

Die Antibiotika-Empfindlichkeitstestung kann z.B. mittels Antibiotika-MHK-Teststreifen (MHK = minimale Hemmkonzentration) oder Antibiotika-Testblättchen nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Das Mikrodilutionsverfahren erfordert CAMHB Medium (pH 7,1 +/- 0,1) mit Zusätzen für anspruchsvolle Bakterien (z.B. IsoVitaleX™) entsprechend CLSI M45 (CLSI, 2016).

Etest Streifen bieten eine einfachere Methode für die MHK-Bestimmung als das Mikrodilutionsverfahren und können sowohl unter S2 als auch S3 Bedingungen durchgeführt werden. (Anda P, Pearson A, Tärnvik A. WHO guidelines on tularaemia. In: Tärnvik A, ed. WHO/CDS/EPR/2007/7: WHO, 2007; 21-6.).

Francisella tularensis kann als Aerosol leicht übertragen werden, deshalb sind Arbeitsschutzmaßnahmen konsequent anzuwenden.

F. tularensis subsp. *holarctica* ist in Deutschland in die Risikogruppe 2 eingestuft, *F. tularensis* subsp. *tularensis* darf nur unter S3 Bedingungen bearbeitet werden. In Europa kommt nur die Subspezies *F. tularensis* subsp. *holarctica* vor. Dennoch ist vor jeder Antibiotika-Resistenztestung oder anderen weiterführenden Untersuchungen die Subspezies zu bestimmen. Geeignete Methoden dafür sind PCRs (z.B. Locus Ft-M19) und MALDI-TOF MS.

Literatur

- Anda P, Pearson A, Tärnvik A. WHO guidelines on tularaemia. In: Tärnvik A, ed. *WHO/CDS/EPR/2007/7*: WHO, 2007; 21-6.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, and Pevzner PA. *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. *J. Comput. Biol.* 2012, 19: 455-77: 455-77.
- Burkhardt, F.: Mikrobiologische Diagnostik, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage, 2002.
- CLSI. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*, 3rd ed. CLSI guideline M45. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016
- Johansson, A., Ibrahim, A., Göransson, I., Eriksson, U., Gurycova, D., Clarridge, JE. 3rd, Sjöstedt, A.: Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4180-5.
- Jorgensen JH, Hindler JA, Bernard K et al. *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline - second edition. CLSI document M45-A2*. Wayne, PA, USA, 2010.
- Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, Mellmann A, Goesmann A, von Haeseler A, Stoye J, and Harmsen D. *Updating benchtop sequencing performance comparison*. *Nat. Biotechnol.* 2013, 31: 294-6: 294-6.
- Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, Kiland Granerud B, Drevinek M, Kokotovic B, Wittwer M, Pflüger V, Di Caro A, Stämmler M, Grunow R, Jacob D. Identification of Highly Pathogenic Microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an Interlaboratory Ring Trial. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2632-40.
- Lärkeryd A, Myrtenäs K, Karlsson E, Dwibedi CK, Forsman M, Larsson P, Johansson A, Sjödin A: CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics* 2014.
- Matero, P., Hemmilä, H., Tomaso, H., Piiparinen, H., Rantakokko-Jalava, K., Nuotio, L., Nikkari, S.: Rapid Field Detection Assays for *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Feb 2. [Epub ahead of print]
- Sato, T., Fujita, H., Ohara, Y., Homma, M.: Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2372-2374.
- Seibold E, Maier T, Kostrzewa M, Zeman E, Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J ClinMicrobiol.* 2010 Apr;48(4):1061-9.
- Silva M, Machado MP, Silva DN, Rossi M, Moran-Gilad J, Santos S, Ramirez M, Carriço JA. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microb Genom.* 2018 Mar 15;4(3):e000166.

- Splettstoesser, W.D., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Neubauer, H., Schuff-Werner, P.: Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. *J.Vet.Med.B.Infect.Dis.Vet.PublicHealth* 2005;52:249-261.
- Tomaso, H., Scholz, H.C., Neubauer, H., Al Dahouk, S., Seibold, E., Landt, O., Forsman, M., Splettstoesser, W.D.: Real-time PCR using hybridization probes for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol Cell Probes*. 2007;21:12-6.
- Versage, J.L., Severin, D.D., Chu, M.C., Petersen, J.M.: Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5492-9.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Anhang

Anhang 1

Cystein-Heart-Agar 1 (CHA1 ohne Antibiotikazusätze)

Zusammensetzung des CHA-1-Agars (für 1 Liter):

| Substanz | Menge | |
|------------------------|-------|---------------------------------------|
| Beef Heart Infusion | 10 g | (z. B. Biozol, Artikel Nr. HDI-C8081) |
| Bacto Proteose Peptone | 10 g | |
| Bacto Dextrose | 10 g | |
| Sodium Chloride | 5 g | |
| L-Cystine | 1 g | |
| Bacto Agar | 15 g | |
| Deionisiertes Wasser | | auf 900 ml Volumen auffüllen |

15 min bei 121 °C autoklavieren

Abkühlen auf 45 - 50 °C

100 mL defibriniertes Schafblut hinzufügen

Cystein-Heart-Agar mit Ampicillin und Polymyxin B (CHA 2)

Dem abgekühlten CHA-Agar (45 - 50 °C) werden zusätzlich zu den oben erwähnten 100 ml Schafblut auch 100 mg Ampicillin und Polymyxin B (600.000 Units), gelöst in 5 ml Wasser mittels Einmalfilter beigemischt.

| Substanz | Menge | Hersteller | Artikelnummer |
|---|---------------|-------------|---------------|
| Ampicillin ($C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$, FW 371.39) | 100 mg | z. B. Sigma | Art-Nr A-9518 |
| Polymyxin B Sulfat ($C_{55}H_{96}N_{16}O_{13} \cdot 2H_2SO_4S$, FW 1385.61 (6000 Units/mg)) | 600.000 Units | z. B. Sigma | Art-Nr P-1004 |

Gut mischen und zu je 20 ml in Petrischalen abfüllen.

Die fertig gegossenen Platten bei Raumtemperatur fest werden lassen und z. B. zu je 10 Stk. in Plastiksäcken verschweißen.

Die Aufbewahrung bis zur Weitergabe erfolgt im Kühlraum.

Kennzeichnung der Petrischalen

Mittels Präger werden das Herstellungsdatum und die Buchstaben der Agarbezeichnung (z. B. CHA1, CHA2) am Rand der Petrischalen angebracht.

MMLA (Modifizierter Martin-Lewis-Agar) kann als fertige Platten zugekauft werden:

Mod. Martin-Lewis-Agar (z. B. BD Diagnostics, Art.-Nr 254029)

Qualitätskontrolle für Chargen der Nährmedien:

| | |
|--|------------|
| <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> | Wachstum |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | Inhibition |

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Anhang 2

Nachweis von *Francisella tularensis* mittels Real-Time PCR nach Versage

1. Anwendungszweck

Schneller Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Francisella tularensis* aus Untersuchungsmaterial mit der Möglichkeit einer Quantifizierung

2. Arbeitsvorschrift

2.1. Material

2.1.1 Geräte

Real-Time Cycler (z. B. LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim)), Vortex-Schüttler, Tischzentrifuge, Laborzentrifuge mit Rotor für Mikrotiterplatten (z. B. Biofuge Stratos (Kendro Laboratory Products, Langenselbold), Automatische Pipetten (0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 10 - 100 µl; 20 - 200 µl und 100 - 1.000 µl), Mehrkanalpipette (z. B. 8-Kanalpipette 10 - 100 µl)

2.1.2 Reagenzien

- Kit zur DNA-Extraktion aus klinischen Proben (z. B. High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics))
- Mastermix für RT-PCR (z. B. LightCycler FastStart DNA MasterPlus HybProbe (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) enthält *Taq*-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs und Farbstoffe
- Primer: Stammlösung 100 pmol/µl, Arbeitskonzentration 10 pmol/µl (Sequenzen und andere Angaben s. Tabelle 1)
- Sonde: lösen in 1mM Tris-HCl pH 8.0/0,01 mM EDTA, so dass sich eine Konzentration von 5 pmol/µl bzw. 5 µM ergibt; in Portionen zu je 200 µl einfrieren (Sequenzen und andere Angaben s. Tabelle 1)

2.2. Durchführungsschritte

2.2.1. Probenaufarbeitung

KLINISCHES MATERIAL: Ein **Gewebestück** von ca. 25 mg wird in 200 µl Lysepuffer des High Pure PCR Template Preparation Kit suspendiert und nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet, um ein Eluat von 200 µl zu erhalten.

2.2.2. Amplifikation

Die Amplifikation wird in geeigneten 96-Well-Platten in 20 µl-Ansätzen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 1 angegeben.

Nach erfolgter Pipettierung werden die Platten an der Oberseite mit Plastikfolie versiegelt und 30 s bei 1.000 rpm zentrifugiert.

Die **Negativkontrollen** (NTC, no-template controls) enthalten 2 µl Wasser anstelle des DNA-Templates.

Als **Positivkontrolle** benutzt man DNA von z. B. *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS.

Die DNA-Konzentration der (internen) **Amplifikationskontrolle** soll so eingestellt sein, dass Ct-Werte um ca. 30 erzielt werden (etwa 1 pg DNA von Bakteriophage Lambda).

Temperatur-Zeit-Profil der real-time PCR:

| | |
|--|-----------------|
| Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase | 2 min bei 50 °C |
| | 2 min bei 95 °C |
| Amplifikation (45 Zyklen) | 30 s bei 95 °C |
| | 30 s bei 60 °C. |

2.3. Ergebnis und Kontrolle

Als **positiver** Befund gilt, wenn eine Probe einen Ct-Wert (Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert) von unter 40 erreicht. Höhere Ct-Werte werden als negativ gewertet.

Bei positiven NTC-Kontrollen ist die Ursache der Kontamination möglichst abzuklären und der Versuch zu wiederholen.

Wenn eine als Francisellen-negativ beurteilte Probe keine Amplifikation oder einen deutlich erhöhten Ct-Wert für die Amplifikationskontrolle hat, ist die DNA Aufreinigung zu verbessern.

Tabelle 1: Mastermix Protokoll für eine real-time PCR für das Zielgen Tul4 (Amplikongröße: 91 bp) zum Nachweis von *Francisella tularensis* mit interner Amplifikationskontrolle (IAC*).

| | Reagentien | Chargen Nummer | Konzentration [pmol/µl] | Finale Konzentration [pmol/µl] | Volumen pro Reaktion [µl] |
|-------------------|--|----------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Wasser | | | | | 2,2 |
| | LightCycler™ 480 Probes Master (04 707 494 001), Roche | | 2 x | 1x | 10 |
| Tul4F | ATTACAATGGCAGGCTCCAGA | | 10 | 0,5 | 1 |
| Tul4R | TGCCCAAGTTTTATCGTTCCTCT | | 10 | 0,5 | 1 |
| Tul4P | FAM-TTCTAAGTGCCATGATACAAGCTTCCCAATTACTAAG-BBQ | | 10 | 0,2 | 0,4 |
| Lambda-F | ATGCCACGTAAGCGAAACA | | 10 | 0,5 | 1 |
| Lambda R | GCATAAACGAAGCAGTCGAGT | | 10 | 0,5 | 1 |
| Lam YAK | YAK-ACCTTACCGAAATCGGTACGGATACCGC-DB | | 10 | 0,2 | 0,4 |
| Interne Kontrolle | Bakteriophage Lambda DNA | | 1pg/µl | | 1,0 |
| Template | | | | | 2 |
| Mastermix | | | | | 18 |
| | | | | gesamt | 20 |

Tularämie (*Francisella tularensis*)

PCR zur Subspeziesdifferenzierung von *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*

1. Anwendungszweck

Diese Duplex-PCR-Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis der Subspezies *holarctica* durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

2. Arbeitsvorschrift

2.1. Material

2.1.1 Geräte

Siehe Real-Time-PCR, statt RT-PCR-Cycler wird ein konventioneller PCR-Cycler verwendet.

2.1.2 Reagenzien

Taq-DNA-Polymerase (z. B. Taq Pol PCR-202L (Jena Bioscience))

Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (z. B. dNTP Set 1 K039.1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe))

Weitere siehe Real-Time-PCR und Tabelle 2

2.2. Durchführungsschritte

2.2.1. Probenaufarbeitung

Für die Analyse kann die für die Real-Time-PCR aufbereitete DNA verwendet werden

2.2.2. Amplifikation

Die Amplifikation wird in geeigneten Reaktionsgefäßen (z. B. 0,2 ml Reaktionsgefäße) in 25 µl-Ansätzen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 2 angegeben.

Nach erfolgter Pipettierung werden die Gefäße geschlossen und 30 s bei 1.000 rpm zentrifugiert.

Die **Negativkontrollen** (NTC, no-template controls) enthalten 1 µl Wasser anstelle des DNA-Templates.

Als **Positivkontrolle** benutzt man DNA von z. B. *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS und *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* ATCC 6223^T.

Temperatur-Zeit-Profil der PCR:

| | | |
|---------------------------|-------|-----------|
| Denaturierung der DNA | 5 min | bei 94 °C |
| Amplifikation (35 Zyklen) | 30 s | bei 94 °C |
| | 60 s | bei 60 °C |
| | 30 s | bei 72 °C |
| abschließende Elongation | 5 min | bei 72 °C |
| Kühlung | | bei 4 °C |

2.3. Ergebnis und Kontrolle

Die Auswertung der PCR ist entsprechend dem folgenden Schema vorzunehmen:

| TUL4-435/ TUL4-863 | FtC1/FtC4 | Ergebnis der PCR |
|-----------------------|-----------|--------------------------------------|
| 428 bp | 170 bp | <i>F. tularensis ssp. holarctica</i> |
| 428 bp | 200 bp | <i>F. tularensis</i> |
| negativ | negativ | negativ |

Tabelle2: PCR Mastermix und Primer

| | | Stamm- lösung | End- konzentration | µl/1 rxn |
|---|-----------------------------|------------------|-----------------------|------------|
| 10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂ | | | 1 : 10 verdünnt | 2,5 |
| Taq-DNA-Polymerase | | 5 U/µL | 1 U/Reaktion | 0,1 |
| Desoxynukleosidtri- phosphat-Mix | | | je 80 µmol/l | 1 |
| Oligonukleotide | 5´-3´ Sequenz | | | |
| TUL4-435 | GCTGTATCATCATTTAATAAACTGCTG | | 0,2 µmol/l | 1 |
| TUL4-863 | TTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT | | 0,2 µmol/l | 1 |
| FtC1 | TCCGGTTGGATAGGTGTTGGATT | | 0,2 µmol/l | 1 |
| FtC4 | GCGCGGATAATTTAAATTTCTCATA | | 0,2 µmol/l | 1 |
| Wasser | | | | 14,9 |
| Template | | | | 2,5 |
| Gesamtvolumen µl | | | | 25 |

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Anhang 3

Serologische Untersuchung auf Tularämie mittels Serumlangsamagglutination (SLA) im Mikroverfahren

1. Geräte u. Materialien

Brutschrank o. Brutraum (37 °C +/- 1 °C)
Kühlschrank (5 °C +/- 3 °C)
Tiefkühlschrank (-21 °C +/- 3 °C)
Präzisionswaage
Pipetten, variabel (10 - 100, 100 - 1000 µL)
Mehrkanalpipette (50 - 200 µL)
Plattenschüttler
Thermoschüttler 56 °C
Feuchte Kammer
Mikrotiter-Platten (U-Profil, 8x12 Wells)
Messpipetten (1,5, 10 ml)
Reagenzgläser

2. Reagenzien und Lösungen

PBS, pH 7,4; +4 °C
Safranin
Brucella-Antigen (BrAg), +4 °C
Tularämie-Antigen (TuAg), +4 °C
Tularämie-Kontrollserum, positiv (PKS), -20 °C
Tularämie-Kontrollserum, negativ (NKS), -20 °C

Safranin-Lösung

0,5 g Safranin
100 ml Reinstwasser
Reinstwasser unter ständigem Schwenken dem Safranin zufügen und bis zur vollständigen Lösung rühren. Lagerung bei +4 °C

Tul-Antigen-Safranin-PBS-Lösung

9 ml PBS + 1 ml Tul-Antigen + 10 µl der 0,5%igen Safranin-Lösung
Verdünnung des Tul-Antigens ist zuvor in einem separaten Ansatz zu ermitteln
(1 : 10 oder 1 : 20 Verdünnung), Lagerung bei +4 °C
Nach längerer Lagerung ist das Antigen mittels Positiv- und Negativkontrolle zu testen.

Brucella-Antigen-Safranin-Lösung

10 ml Brucella-Antigen (unverdünnt) + 10 µl Safranin-Lösung

3. Durchführung:

3.1 Vorbereitung

Jede Serumprobe wird auf Tularämie-Antikörper und Brucellose-Antikörper untersucht (getrennte Ansätze). Es ist, bei ausreichendem Probenmaterial, eine Doppelbestimmung je Serum durchzuführen.

Im Untersuchungsansatz zu Tularämie-Antikörpern ist ein positives (PKS) und ein negatives Kontrollserum (NKS) mitzuführen. Außerdem erfolgt bei jedem SLA-Ansatz die Kontrolle des Tularämie- und des Brucellose-Antigens.

Vorbereitung der Proben: Inaktivierung 30 min bei 56 °C im Thermoschüttler.

3.2 Durchführung des Agglutinationstestes

Ansatz für eine Serumprobe

Vorlegen des PBS-Safranin-Antigen-Gemisches

Ansatz zur Überprüfung auf Tularämie-Antikörper:

In die Wells A1 bis A4 werden je 90 µl des PBS-Safranin-Antigen-Gemisches pipettiert. 50 µl des Gemisches kommen in die Wells B1 - B4, C1 - C4, D1 - D4 und A5 (Antigenkontrolle Tularämie).

Ansatz zur Überprüfung auf Brucellose-Antikörper:

90 µl des Brucellose-Safranin-Gemisches pipettiert man in die Wells E1 - E4. 50 µl des Gemisches kommen in die Wells A6 (Antigenkontrolle Brucellose), F1 - F4, G1 - G4 und H1 - H4.

Anfertigen der Serumverdünnungen

10 µl der Serumprobe pipettiert man in die Positionen A1, A2, E1 und E2.

Bei A1 beginnend werden 50 µl des Ansatzes in B1 übertragen und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Gleiche Vorgehensweise bis D1. Aus D1 werden 50 µl des Ansatzes nach dem Mischen verworfen, so dass in jedem Well 50 µl vorliegen. Die Positionen A2, E1 und E2 werden nach gleicher Prozedur bearbeitet.

10 µl der Positivkontrolle pipettiert man in A3 und **10 µl Negativserum** in A4 (Tularämie). Die Kontrollen werden analog der Serumverdünnung bearbeitet.

Für die Serumverdünnungen ist das Arbeiten mit einer Mehrkanalpipette von Vorteil.

Mikrotestplatte schütteln: 20 sec (z.B. IKA KS 130 basic, 480/min).

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Platte mit Deckel versehen und in einer feuchten Kammer bei 37 °C 20 bis 24 Stunden inkubieren.

4. Kontrollsystem und Interpretation der Ergebnisse

Ablesen der Ergebnisse durch Beurteilung des Sedimentes

Ausbleibende Reaktion = negativ

- Eindeutige, glattrandige Knopfbildung des Antigens.

Positive Reaktion

- Kranzförmige, diffuse Ablagerung der Antigen-/AK-Partikel auf dem Boden ohne scharfe Begrenzung (Agglutination), mitunter an den Rändern leicht eingerollt. Der Agglutinationsgrad wird nach Intensitätsstufen abgeschätzt: 0, +, ++, +++, +++++ d. h. negativ, 25, 50, 75, 100 % Agglutination mit bzw. ohne Sedimentation des Antigens. Als Titer wird das letzte Well mit Agglutination abgelesen. Titer $\geq 1 : 20$ werden als positiv beurteilt.

Positivkontrolle (PKS)

- Muss dem angegebenen Titer (+/- eine Titerstufe) entsprechen.

Negativkontrolle (NKS)

- In jeder Serumverdünnung muss eine eindeutige Knopfbildung d. h. eine 100%ige Sedimentation des Antigens erkennbar sein.

Antigenkontrolle

- Eindeutige Knopfbildung d. h. 100%ige Sedimentation des Antigens.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Datum/Uhrzeit: _____

Durchgeführt von: _____

Inaktivierung der Seren: 56 °C / 30 min: _____

Antigen und -Verdünnungen (AGK)_(Chargen-Nr./Gebrauchsverdünnung): _____

Kontrollserum, positiv_(PKS), Chargen-Nr./Verdünnung: _____

Kontrollserum, negativ_(NKS), Chargen-Nr./Verdünnung: _____

Bemerkungen: _____

| | Brucella Antigen | | | | Tularämie Antigen | | | | Platten-Nr. |
|----------|------------------|------|------|------|-------------------|------|------|------|-------------|
| | H | G | F | E | D | C | B | A | |
| AK-Titer | 1:80 | 1:40 | 1:20 | 1:10 | 1:80 | 1:40 | 1:20 | 1:10 | Probe: |
| | | | | | | | | | 1 |
| | | | | | | | | | 2 |
| | | | | | | | | | 3 |
| | | | | | | | | | 4 |
| | | | | | | | | | 5 |
| | | | | | | | | | 6 |
| | | | | | | | | | 7 |
| | | | | | | | | | 8 |
| | | | | | | | | | 9 |
| | | | | | | | | | 10 |
| | | | | | | | | | 11 |
| | | | | | | | | | 12 |

| | Datum | Uhrzeit | Bemerkung | Untersucher |
|----------|-------|---------|-----------|-------------|
| Ablesung | | | | |

Falldefinition - Tularämie (Hasenpest, Nagerpest); *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (syn. *nearctica*, Biovar Typ A); subsp. *holarctica* (syn. *Palaearctica*, Biovar Typ B), subsp. *novicida*, Biovar Typ C; *F. philomiragia*

Klinisches Bild

Betroffen sind vorwiegend Nagetiere, aber auch eine Vielzahl anderer Tiere einschließlich Vögel mit unterschiedlicher Empfänglichkeit.

Bei akutem Verlauf: Apathie, Fieber und Tachypnoe, Fellsträuben, innerhalb von zwei bis 13 Tagen, je nach Infektionsdosis und Empfänglichkeit, sind die meisten Tiere verendet (Septikämie).

Bei chronischem Verlauf: Hochgradige Abmagerung, Entkräftung, geschwürige Hautveränderungen, Schwellung der Lymphknoten, nach zwei bis sechs Wochen letaler Ausgang möglich.

Inkubationszeit: zwei bis zehn Tage, meist zwei bis drei Tage

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

Erregernachweis:

in Organmaterial, Ex - und Sekreten bzw. in Umweltproben (Wasser)

- Antigennachweis (Immunoassay, Immunofluoreszenztest im Gewebe)
- Genomnachweis (PCR)
- Erregernachweis (Erregeranzucht und -identifizierung)
- Erregeridentifikation mit MALDI-TOF MS

Indirekter Nachweis:

- Antikörpernachweis im Blutserum mittels Serumagglutinationstest (SLA) im Mikroverfahren ($\geq 1 : 20$), ELISA oder Immunoblot

Zusatzinformation

Bei klinischen und postmortalen Befunden ist differenzialdiagnostisch *Y. pseudotuberculosis* auszuschließen. Beim Nachweis von Antikörpern sind positive Befunde insbesondere des SLA einer Spezifitätskontrolle mit Brucella-Antigen zu unterziehen.

Epidemiologischer Zusammenhang

Als Infektionsquelle für den Menschen kommen in Frage: Haut - und Schleimhautkontakte mit infektiösem Tiermaterial, Verzehr von nicht ausreichend erhitztem, kontaminiertem Fleisch (Hasen) oder Wasser, Übertragung durch Blut saugende Insekten oder Zecken, kontaminierte Stäube und Aerosole.

Voraussetzung für den Verdacht

Vorliegen klinischer Symptome oder postmortaler Befunde (Schwellung von Lymphknoten, Leber und Milz sowie miliare grau-gelbe Herde in Leber und Milz).

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzung für die Feststellung eines Falles:

- Vorliegen klinischer Symptome und kultureller Erregernachweis oder Antigen- oder Genomnachweis
- Nachweis von Antikörpern z. B. bei SLA $\geq 1 : 20$ oder bei einem Serumpaar mindestens 4-fachem Antikörperanstieg

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils geltenden Fassung

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der jeweils geltenden Fassung