

Amtliche Methode und Falldefinition

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	4
1.3 Differentialdiagnose	4
1.4 Zuständige Untersuchungseinrichtung	5
1.5 Rechtsgrundlagen.....	5
2. Untersuchungsmaterial	6
3. Untersuchungsgang	7
3.1 Nachweis von Lyssavirus Antigen	7
3.2 Virusisolierung in der Zellkultur	8
3.3 Nukleinsäurenachweis in der RT-PCR	9
3.4 Nachweis spezifischer Antikörper	12
Anhang	15
Literatur	17
Falldefinition - Tollwut; Tollwutvirus	18

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Erreger der Tollwut sind Einzelstrang-RNA-Viren negativer Polarität, die zum Genus Lyssavirus, der Familie der *Rhabdoviridae* der Ordnung *Mononegavirales* gehören (siehe Tabelle). Das Rabies Virus (RABV) ist der Erreger der weltweit vorkommenden „klassischen Tollwut“, für welche Mesokarnivore (Hund, Fuchs, Coyote, Waschbär, Marderhund, Skunk, Mangusten) sowie in Amerika auch Fledermäuse die Hauptreservoir darstellen. Neben dem RABV umfasst der Genus Lyssavirus derzeit weitere 17 anerkannte und 3 putative Lyssaviruspezies (ICTV), für die verschiedenste Fledermausarten Reservoir bilden. Einzig für das Mokolavirus und das Ikomavirus sind bislang die Reservoirspezies unbekannt. In Europa sind fünf sechs verschiedene Fledermaus-assoziierte Lyssaviren nachgewiesen worden: (i) EBLV-1 (*Eptesicus serotinus*, *E. isabellinus*), (ii) EBLV-2 (*Myotis daubentoni*, *M. dasycneme*), (iii) WCBV (*Miniopterus schreibersi*), BBLV (*M. nattereri*), und das LLEBV (*M. schreibersi*) und das KBLV (Tabelle 1). Die Langflügel-Fledermaus (*M. schreibersi*) ist in unseren Breitengraden als Durchzügler nur ein seltener Gast, so dass die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von WCBV und LLEBV in Deutschland sehr gering ist. Spill-over Infektionen von europäischen Fledermaus-assoziierten Lyssaviren auf andere Tierarten sind sehr selten.

Virusname	Abk.	Wirtsspektrum	Verbreitung
Rabies virus	RABV	Wild- und Haustiere, hämatophage, Insekten- und Fruchtfleisch-fressende Fledermäuse (Nord-, Südamerika), Mensch	Europa, Asien, Amerika, Afrika
European bat lyssavirus 1	EBLV-1	Insekten fressende Fledermäuse <i>Eptesicus serotinus</i> , <i>E. isabellinus</i>	Europa
European bat lyssavirus 2	EBLV-2	Insekten fressende Fledermäuse <i>Myotis daubentoni</i> , <i>M. dasycneme</i>	
Bokeloh bat lyssavirus	BBLV	<i>Myotis nattereri</i>	
Lleida bat lyssavirus	LLEBV	isoliert aus <i>Miniopterus schreibersi</i> (Iberische Halbinsel)	
West caucasian bat virus	WCBV	isoliert aus <i>Miniopterus schreibersi</i> (Kaukasusregion)	
Kotalahti bat lyssavirus*	KBLV	nachgewiesen in <i>Myotis brandtii</i> (Finnland)	
Lagos bat virus	LBV	Fruchtfleisch fressende Fledermäuse (<i>Megachiroptera</i>) Flughunde (<i>Pteropodidae</i>)	Afrika
Mokola virus	MOKV	? (isoliert aus Spitzmäusen, Nagern, Mensch, Hunde, Katzen)	
Matlo bat virus*	MBLV	isoliert aus <i>Miniopterus natalensis</i>	
Duvenhage virus	DUVV	Insekten fressende Fledermäuse (<i>Nycteris thebaica</i> , <i>Miniopterus schreibersi</i> , <i>M. natalensis</i>)	
Shimoni bat virus	SHIBV	isoliert aus <i>Hipposideros commersoni</i>	

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

Ikoma virus	I KOV	? (isoliert aus der Afrikanische Zibetkatze, <i>Civettictis civetta</i>)	
Australian bat lyssavirus	ABLV	Flughunde (<i>Pteropodidae</i>) und Insekten fressende Fledermäuse (<i>Mega-Microchiroptera</i>) (<i>Saccolaimus flaviventris</i>)	Australien
Aravan virus	ARAV	isoliert aus <i>Myotis blythi</i>	Asien
Khujand virus	KHUV	isoliert aus <i>Myotis mystacinus</i>	
Irkut virus	IRKV	isoliert aus <i>Murina leucogaster</i>	
Gannoruwa bat lyssavirus	GBLV	Isoliert aus <i>Pteropus medius</i> (Sri Lanka)	
Taiwanese bat lyssavirus 1	TWBLV 1	Isoliert aus <i>Pipistrellus javanicus-abramus</i> (Taiwan)	
Taiwanese bat lyssavirus 2*	TWBLV 2	Isoliert aus <i>Nyctalus velutinus</i> (Taiwan)	

*derzeit nicht von ICTV klassifiziert

1.2 Klinische Symptomatik

Die Inkubationszeit variiert zwischen drei Wochen bis zu mehreren Monaten (**sehr selten**). Bei der rasenden Wut zeigen sich folgende klinischen Symptome: Wesensveränderungen, Hypersensibilität, Aggressivität, Paralyse, Lähmungen, Speicheln, Unterkieferlähmung, Erstickungsanfälle, Festliegen. Bei der sogenannten stillen Wut gehen die Anfangssymptome schnell in Lähmungen über, ohne dass dabei Anzeichen von Hypersensibilität und Aggressivität auftreten. Die Tiere leiden unter Krämpfen und Lähmungen. Die Erkrankung führt immer zum Tod. Beim Menschen sind Aerophobie und Hydrophobie prognostisch. Bei Fledermäusen sind hauptsächlich Lähmungen und Orientierungslosigkeit beschrieben worden, aber auch aggressives Verhalten.

1.3 Differenzialdiagnose

Es sind alle ZNS-Erkrankungen insbesondere Aujeszky'sche Krankheit, Bornasche Krankheit, Toxoplasmose, Listeriose, Kochsalzvergiftung beim Schwein, Staupe, Fuchsenzephalitis etc. einzubeziehen. Bei Fledermäusen: Traumata; physiologische Lethargie durch Torpor oder Winterschlaf; Intoxikationen; andere infektiöse Erkrankungen.

Diagnostische Indikation

- Differentialdiagnostische Abklärung bei Tieren mit zentralnervösen Störungen bei klinischem oder epidemiologisch (z. B. Import, Kontakt zu Fledermaus) begründetem Verdacht
- Abklärungsuntersuchungen im Rahmen der post-expositionellen Prophylaxe (PEP) beim Menschen (Bisskontakt, Kontakt mit Fledermäusen)
- Serologie: Verbringen von Tieren, Ein- und Ausfuhr, Begleitung von Surveillance- und Bekämpfungsprogrammen

Achtung: Fledermäuse sind streng geschützte Tierarten (EUROBATS, Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie - 92/43/EWG, Bundesartenschutzverordnung - BartSchV). Daher ist die gezielte Tötung von Fledermäusen, sei es aus dem Wunsch, eine eindeutige Diagnose zu stellen oder zur „Prävention“ bei festgestellter Tollwut innerhalb einer Kolonie, weder sinnvoll noch statthaft.

1.4 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungs-, Tiergesundheitsämter bzw. staatliche Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsämter der Bundesländer
- Nationales Referenzlabor (NRL): Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (nationales und OIE Referenzlabor für Tollwut, WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research), Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie, Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Tel. 038351 1659/1660.

1.5 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

EU-Recht

- 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“) (Text von Bedeutung für den EWR) in Verbindung mit
- 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 (Text von Bedeutung für den EWR) (Text von Bedeutung für den EWR)
- Durchführungsverordnung (EU) 2021/620 der Kommission vom 15. April 2021 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Genehmigung des Status „seuchenfrei“ und des Status der Nichtimpfung für bestimmte Mitgliedstaaten oder Zonen oder Kompartimente dieser Mitgliedstaaten in Bezug auf bestimmte gelistete Seuchen und der Genehmigung von Tilgungsprogrammen für diese gelisteten Seuchen (Text von Bedeutung für den EWR)
- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- 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

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

- VERORDNUNG (EU) Nr. 576/2013 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 12. Juni 2013 über die Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 998/2003

Deutsches Recht

- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung.
- Tollwut-Verordnung in der jeweils gültigen Fassung

Andere Rechtsgrundlagen

- Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE WOAH): Chapter 8.14. Infection with rabies virus. In: OIE WOAH Terrestrial Animal Health Code, Paris, 2018. Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE): Chapter 3.1.17. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris, (NB: Version adopted in May 2018).
- Weltorganisation für Tiergesundheit (WOAH): Chapter 3.1.18. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris
- ~~VERORDNUNG (EG) Nr. 998/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 26. Mai 2003 über die Veterinärbedingungen für die Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken und zur Änderung der Richtlinie 92/65/EWG des Rates.~~
- ~~2000/258/EG: Entscheidung des Rates vom 20. März 2000 zur Bestimmung eines spezifischen Instituts, das für die Aufstellung der Kriterien für die Normung der serologischen Tests zur Kontrolle der Wirksamkeit der Tollwutimpfstoffe verantwortlich ist, Amtsblatt Nr. L 079 vom 30/03/2000 S. 0040 – 0042.~~

2. Untersuchungsmaterial

Untersuchungsmaterial Erregernachweis:

Gehirnmaterial (Ammonshorn, Cerebellum, Pons oder Medulla oblongata); Speicheldrüsen (Parotis) sind nur in Ausnahmefällen zu empfehlen (Fehlen von Gehirnmaterial) und bieten keine ausreichende diagnostische Sicherheit; Menge: ca. 1 cm³

Versand: Gehirn, tiefgefroren (z. B. mit Trockeneis), ggf. Tierkörper
Bei Fledermäusen sollte vorzugsweise der Tierkörper mit eingeschendet werden
(Speziesidentifizierung)

Untersuchungsmaterial zur Kontrolle von Impfmaßnahme:

- Ca. 0,5 ml (Minimum) Serum zur serologischen Kontrolle von Impfmaßnahmen bei Haustieren (parenterale Immunisierung)
- Ca. 0,5 ml (Minimum) Brusthöhlen- u. Bauchhöhlentranssudat (nicht älter als drei Tage *post mortem*) zur serologischen Kontrolle von Impfmaßnahmen bei Wildtieren (orale Immunisierung).

3. Untersuchungsgang

Die Diagnose einer Lyssavirus-Infektion (Tollwut) beruht auf dem direkten Nachweis von lyssaviralem Antigen (IFT), infektiösem Virus mittels Zellkultur oder lyssaviraler RNA (PCR) im Gehirn tollwutverdächtiger Tiere. Für die Routinediagnostik können sowohl der IFT als auch die PCR eingesetzt werden. Für den Ausschluss einer Infektion mit Lyssaviren ist ein negatives Ergebnis hinreichend.

Bei humaner Exposition ist ein positives Ergebnis in einem der drei genannten Verfahren indikativ für eine postexpositionelle Prophylaxe (PEP). Für die amtliche Feststellung eines Tollwutfalles ist jedoch der Antigen- oder Virusnachweis maßgebend!

Die SOPs als auch Positiv- und Negativkontrollen für sämtliche nachfolgend beschriebenen diagnostischen Verfahren können vom NRL erbeten werden. Zelllinien inklusive Informationen zu den empfohlenen Anzucht- und Erhaltungsmedien können über die Bio-Bank für Zelllinien in der Veterinärmedizin am FLI, Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit, Insel Riems, Dr. S. Reiche, bezogen werden.

3.1 Nachweis von Lyssavirus Antigen

Der Antigennachweis erfolgt mittels direktem Immunfluoreszenztest (IFT).

Herstellung der Präparate

Es ist darauf zu achten, dass Soweit möglich, sollte jeweils stets ein Gewebestück vom Ammonshorn, Cerebellum sowie Pons oder Medulla oblongata von einem Tier auf einem Objektträger (OT) untersucht werden wird! Bei Wildtieren ist dies oft nicht möglich; hier kann eine Probe, die Teile der obengenannten Gewebestücke enthält, durch Einführen eines stabilen Kunststoffzylinders in das Foramen occipitale in Richtung Auge gewonnen werden. Das entnommene Gewebestück wird unter leichtem Druck auf fett- und fluoreszenzfreien OT mehrmals getupft. Nach Fixierung mittels Aceton oder Hitze werden tollwutspezifische Antigene unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen amtlich zugelassenen FITC-Antitollwut-Konjugates detektiert.

Ein gut weizenkorngroßes Gewebestück mittels Skalpellspitze oder Pinzette entnehmen und unter leichtem Druck auf fett- und fluoreszenzfreien OT unter mäßigem Druck mehrmals tupfen, so dass ein im Durchmesser etwa 1 cm großes Präparat entsteht (vorgefertigte OT benutzen).

Präparate lufttrocknen. Fixieren durch Hitze (dreimal leicht durch die offene Flamme eines Bunsenbrenners ziehen) oder 30 min in -20°C Aceton.

Direkte Immunfluoreszenz

- Inkubation mit kommerziell erhältlichem zugelassenem FITC-Antitollwut-Konjugat (Gebrauchsverdünnung lt. Hersteller)
- OT 2 x 5 min mit Tollwut(TW)-Puffer, pH 7,8, bzw. mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer waschen, spülen in Aqua dest.,
- Präparat lufttrocknen,

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

- * Eindecken der Präparate in isotonischem Phosphatpuffer (IP)-Glycerol (9 : 1) oder Immersionsöl
- * Fluoreszenzmikroskopie bei mindestens 300-facher Vergrößerung, mäanderförmige Durchmusterung aller drei Gewebeproben

3.2 Virusisolierung in der Zellkultur

Die Virusisolierung in der Zellkultur ist ein Bestätigungs- bzw. Abklärungstest. Die Identifizierung replikationsfähiger Lyssaviren erfolgt unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen amtlich zugelassenen FITC Antitollwut-Konjugates.

Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

- * Herstellung einer 20%igen Gehirnsuspension in Medium,
- * 30 min bei 4 °C absetzen lassen, zentrifugieren bei 3.000 UpM für 10 min,
- * Überstand kurzfristig bei 4 °C aufbewahren, längere Lagerung bei -70 °C, nicht bei -20 °C!
- * Zellen (Na42/13) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Dextran-Gebrauchslösung aufnehmen, 10 min einwirken lassen,
- * 0,5 ml Zellsuspension mit 0,5 ml Überstand mischen. 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren, dazwischen zwei- bis dreimal die Zellen vorsichtig aufwirbeln,
- * Zellsuspension abzentrifugieren, Zellpellet in 10 ml Medium aufnehmen und 8 ml in Gewebekulturflasche (T25) sowie 2 ml in 6er- bzw. 24er-well-Platte für IFT-Kontrolle aussäen,
- * Inkubation 3 - 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂,
- * IFT-Kontrolle.

Das Mitführen einer Negativ- und Positivkontrolle wird empfohlen. Positive Kontrolle: Zellkultur, beimpft mit positivem Untersuchungsmaterial mit bekanntem Virusgehalt in einer Konzentration, die das Auszählen der fluoreszierenden Zellen bzw. Zellgruppen erlaubt (Sensitivitätskontrolle) oder IFT-positives Gehirnmateriale. Mitunter kann eine mehrfache Passagierung notwendig sein. In der Regel werden drei Passagen empfohlen, um ein negatives Ergebnis zu bestätigen.

Immunfluoreszenztechnik (IFT-Kontrolle)

- * Medium absaugen, mit TW-Puffer oder PBS spülen,
- * Fixierung in 80%igem Aceton oder 3%igem PFA für 30 min trocknen, Lage markieren,
- * Färben mit kommerziell erhältlichem Konjugat, für 30 min bei 37 °C in feuchter Kammer,
- * zweimal mit TW-Puffer spülen, Zugabe von Aqua bidest,
- * Fluoreszenzmikroskopie bei ca. 300-facher, im Zweifelsfall bei 400-facher Vergrößerung, Auswertung des gesamten markierten Bereiches.

3.3 Nukleinsäurenachweis in der RT-PCR

Die RT-PCR wird zum Nachweis von lyssaviraler RNA in Organproben (Gehirn, Speicheldrüse) oder Speichelproben genutzt. Soll die globale und regionale Diversität der Lyssaviren im Testansatz berücksichtigt werden, sind die pan-lyssa PCRs von [Hayman et al. \(2014\)](#), [Fischer et al. \(2014\)](#) und [Gigante et al. \(2018\)](#) wie beschrieben anzuwenden. Bei diesem Vorgehen ist es möglich, auch derzeit in Deutschland noch nicht beschriebene Lyssavirus-Spezies bzw. Spillover-Infektionen solcher zu detektieren. Zielt die Testung nur auf die klassische Tollwut (RABV) bzw. die in Deutschland bei einheimischen Fledermäusen bekannten, endemisch vorkommenden Lyssaviren (EBLV-1, EBLV-2, BBLV) ab, sind speziesspezifische, sondenbasierte Assays zu verwenden. Das FLI empfiehlt hier die modifizierte Multiplex PCR von [Fischer et al. \(2014\)](#), die Primer und Sonden für RABV (R13, R14) ([Hoffmann et al. \(2020\)](#)), sowie EBLV-1, EBLV-2, BBLV und interne Kontrollen umfasst (siehe unten). Grundsätzlich sind bei der Verwendung der hochsensitiven molekularen Diagnostik die Maßnahmen zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen zu beachten. Die Verwendung von artifiziellen Positivkontrollen wird empfohlen.

Prüfprotokoll nach Fischer et al. (2014):

Friedrich-Loeffler-Institut Standort Insel Riems	Prüfprotokoll RT-qPCR Multiplex -R14 MP-		Laborarbeitsanweisung R14 multiplex realtime PCR Version: R14 RT-qPCR_V2			
Lab-Nr.:	RNA-Extraktion:		RT-qPCR:			
	Datum:	Bearbeiter:	Datum:	Zeit:	Bearbeiter:	
Cycler:						
Speicherplatz:						
Anmerkungen:						
Mastermix AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied-Biosystems) (Artikel Nr. 4387424 or: # 4387391)			Lyssavirus-Nachweis			
			1 x	_____	1x	_____
			x in µl		x in µl	
RNase freies Wasser			1,25 µl		2,25µl	
2x RT-PCR Puffer			6,25 µl		6,25µl	
25x RT-PCR Enzym Mix			0,5 µl		0,5µl	
RABV-R13/14-Mix-FAM			0,5 µl			
EBLV-1-Mix3-HEX			0,5 µl			
EBLV-2-Mix8-Cy5			0,25 µl			
BBLV-Mix-TEX			0,25 µl			
Beta-Actin-Mix2-HEX					1µl	
Gesamtvolumen Mastermix:			10,0 µl		10,0 µl	
RNA-Template (Testprobe, RNA-Isolationskontrollen, PK, NK)			2,5 µl			

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													
Cycler-Programm: # Nachweis: FAM, HEX, Cy5 and TEX während Annealingphase					Reverse Transkription Inaktiv./Aktiv. Denaturierung Annealing Elongation			10 min 10 min 15 sec 20 sec 30 sec		45 °C 95 °C 95 °C 56 °C 72 °C		42 Zyklen	

Sequenzen und Stoffmengen der Primer-Sonden-Mixe:**R13/14-Mix-FAM**

Volumen	Oligo (Konzentration)	Sequenz Primer/Sonde (5' - 3')
20,0 µl	RV-N-196-F (100 pmol/µl)	GAT CCT GAT GAY GTA TGT TCC TA
20,0 µl	RV-N-283-R (100 pmol/µl)	RGA TTC CGT AGC TRG TCC A
5,0 µl	RabGT1-B-FAM (100 pmol/µl)	FAM- CAG CAA TGC AGT TYT TTG AGG GGA C -BHQ1
20,0 µl	RV-N-JW12 (100 pmol/µl)	ATG TAA CAC CYC TAC AAT G
20,0 µl	RV-N-165-146 (100 pmol/µl)	GCA GGG TAY TTR TAC TCA TA
5,0 µl	LysGT1-B-FAM (100 pmol/µl)	FAM- ACA AGA TTG TAT TCA AAG TCA ATA ATC AG - BHQ1
110,0 µl	0.1 x TE (pH 8.0)	
200,0 µl	Primer-Sonden-Mix	

EBLV-1-Mix3-HEX

Volumen	Oligo (Konzentration)	Sequenz Primer/Sonde (5' - 3')
20,0 µl	EBLV1-353F (100 pmol/µl)	GCT CAA ACR GGA GGT CAA GA
20,0 µl	EBLV1-440R (100 pmol/µl)	AGA CAR AGA AGA AGT CCW ACC A
5,0 µl	EBLV1-392HEX (100 pmol/µl)	HEX- ACC CTA CRA CAC CTG AAC ATG CAT CT -BHQ1
155,0 µl	0.1 x TE (pH 8.0)	
200,0 µl	Primer-Sonden-Mix	

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

EBLV-2-Mix8-Cy5

Volume	Oligo (Konzentration)	Sequenz Primer/Sonde (5' - 3')
30,0 µl	EBLV2-42F (100 pmol/µl)	RGT GTC TGT AAA RCC AGA AG
30,0 µl	EBLV2-173R (100 pmol/µl)	GAC AGA ATR GAC TTA TAA GCT CT
5,0 µl	EBLV2 N Probe (100 pmol/µl)	Cy5-TCG GAA AAA ACC CAG CAT AAC CCT-BHQ2
135,0 µl	0.1 x TE (pH 8.0)	
200,0 µl	Primer-Sonden-Mix	

BBLV-Mix-TEX

Volume	Oligo (Konzentration)	Sequenz Primer/Sonde (5' - 3')
20,0 µl	BBLV-2F (100 pmol/µl)	CCT TGG TRA ACA TTC AGA GAA CG
20,0 µl	BBLV-2R (100 pmol/µl)	GGC CAC AGT TGG ATC CCT TG
5,0 µl	BBLV-2TEX_as (100 pmol/µl)	TEX-TCC TCC GGT CAA GGC CCA RTT GCC-BHQ2
155,0 µl	0.1 x TE (pH 8.0)	
200,0 µl	Primer-Sonden-Mix	

3.4 Nachweis spezifischer Antikörper

Serologische Nachweisverfahren können aufgrund der Viruspathogenese nicht zur Diagnose der Tollwut eingesetzt werden, sondern weisen durch Impfung induzierte Antikörper nach. Bei der Tollwut wird der indirekte (serologische) Erregernachweis nicht zur Diagnose eingesetzt, sondern weist durch Impfung induzierte Antikörper nach. Der Rapid Fluorescence Focus Inhibition Test (RFFIT - Moore *et al.* (2017)) und der Fluorescence Antibody Virus Neutralization Test (FAVN - Cliquet *et al.* (1998)) sind ist eine fluoreszenzserologische Methoden zur Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern gegen Tollwut. Der Beide Tests können zum serologischen Monitoring des Impferfolgs oraler Immunisierungskampagnen bei Füchsen Anwendung finden, die Qualität der Proben ist ein wesentlicher limitierender Faktor. wird im Zusammenhang mit der oralen Immunisierung der Füchse gegen Tollwut als eine Methode zur Überprüfung des Impferfolges im Rahmen von Impfkampagnen in Fuchspopulationen benutzt.

Seren von Füchsen sollten zur Verwendung im RFFIT nicht älter als drei Tage sein!

Der Fluorescence Antibody Virus Neutralization Test (FAVN) wird vorzugsweise als serologischer Test zur Kontrolle der Wirksamkeit der Tollwutimpfstoffe im Rahmen der Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken (998/2003/EG) (Verordnung (EU) Nr. 576/2013) angewendet.

Tollwutspezifische bindende Antikörper können über enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) nachgewiesen werden. Derzeit sind keine ELISA Tests amtlich zugelassen.

REFIT

Ausführung (Kurzfassung):

- * Virusvermehrung aus Masterstockvirus (Laborstamm CVS 11) auf BHK 21 C13 oder BHK 21-BSR/ P5 88-Zellen in Zellkulturflaschen (Dichte 100.000 Zellen/ml),
- * Virusernte erfolgt, wenn das Virus etwa zu 100 % abgegeben wurde (IFT-Kontrolle), Überstand abgießen, pH-Wert auf 7,6 bis 7,8 einstellen, Zentrifugation bei 3.000 UpM für ca. 10 min,
- * Titration des Arbeitsvirus auf Mikrotiterplatten (Vierfachansatz), Bestimmung des Virustiters nach Kärber, Portionierung z. B. 0,5 ml, Lagerung bei -80 °C (Masterstock),
- * Einstellen der Virusgebrauchsverdünnung auf 40 infizierte Zellen nach vorheriger Bestimmung,
- * Serum von Nativblutproben (keine EDTA-Plasmaproben); Inaktivierung in Serumverdünnung (1 : 10 in Medium) für 30 min bei 56 °C im Wasserbad oder Heizblock, Zentrifugation bei 3.000 UpM für 10 min,
- * Test- und Referenzseren (kalibriertes Positiv- und Negativserum) in log₂-Schritten in Mikrotiterplatte oder Röhrchen im Doppelansatz weiterverdünnen (50 µl Endvolumen),
- * Zugabe eines äquivalenten Volumens (50 µl) der Virusgebrauchsverdünnung, Inkubation für 90 min bei 37 °C und 5 % CO₂,
- * Herstellen der Zellsuspension kurz vor Ablauf der Inkubationszeit (1 x 10⁶ Zellen/ml), Zugabe von 100 µl Zellsuspension/well, kurz schütteln,
- * nach vorheriger guter Durchmischung (Plattenschüttler, 5 sec) 10 µl des Virus-Serum-Zell-Gemisches der Mikrotiter- oder Verdünnungsplatte auf die äquivalenten Vertiefungen einer Terasakiplatte übertragen, nach Übertragung einer Verdünnungsreihe erneut schütteln,
- * Virus- und Zellkontrolle mitführen,
- * Platten für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer feuchten Kammer inkubieren,
- * Terasakiplatte einmal vorsichtig mit TW-Puffer spülen, anschließend mit Aceton (80 %) 30 min bei 4 °C fixieren, trocknen,
- * Zugabe von 10 µl eines FITC-Antitollwut-Konjugates (Gebrauchsverdünnung lt. Hersteller), 30 bis 60 min in feuchter Kammer inkubieren, anschließend zweimal mit TW-Puffer und einmal mit Aqua dest. spülen,
- * fluoreszenzmikroskopische Ablesung des Tests, Bestimmung des nAk-Titers nach Kärber (Grenzwert > 1 : 60) oder Umrechnung in internationale Einheiten (Grenzwert > 0,5 IU/ml)

FAVN

Ausführung (detaillierte Beschreibung im O.I.E. Manual of Standards):

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

- * Virusvermehrung aus Masterstockvirus (Laborstamm CVS 11) auf BHK 21 C13 oder BHK21-BSR/P5 88-Zellen in Zellkulturflaschen (Dichte 100.000 Zellen/ml),
- * Virusernte erfolgt, wenn das Virus etwa zu 100 % abgegeben wurde (IFT-Kontrolle), Überstand abgießen, pH-Wert auf 7,6 bis 7,8 einstellen, Zentrifugation bei 3.000 UpM für ca. 10 min,
- * Titration des Arbeitsvirus auf Mikrotiterplatten (Vierfachansatz), Bestimmung des Virustiters nach Kärber, Portionierung z. B. 0,5 ml, Lagerung bei -80 °C (Masterstock),
- * Einstellen der Virussuspension auf 100 KID50/0,05 ml,
- * Serum von Nativblutproben (keine EDTA-Plasmaproben); Inaktivierung unverdünnt oder in Serumverdünnung (1 : 3 in Medium, PBS) für 30 min bei 56 °C im Wasserbad oder Heizblock, Zentrifugation bei 3.000 UpM für 10 min,
- * Test- und Referenzseren (WHO-Standardserum, O.I.E. Standardserum vom Hund, kalibriertes Positiv- und Negativserum) in log₃-Schritten in Mikrotiterplatte im Vierfachansatz weiterverdünnen (50 µl Endvolumen)
- * Zugabe der Virusgebrauchsverdünnung (50 µl), Inkubation für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂,
- * Herstellen der Zellsuspension kurz vor Ablauf der Inkubationszeit (4 x 10⁵ Zellen/ml) in Medium, Zugabe von 50 µl Zellsuspension/well, kurz schütteln,
- * auf einer Mikrotiterplatte Virus- (Virustitration), Zell-, Positiv- und Negativkontrollen sowie Standardreferenzseren im Vierfachansatz mitführen,
- * Platten für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren,
- * Mikrotiterplatte vorsichtig spülen, anschließend mit Aceton (80 %) oder PFA (3 %) 30 min bei Raumtemperatur fixieren, trocknen,
- * Zugabe von 50 µl eines Tollwut-Konjugates (Gebrauchsverdünnung lt. Hersteller), 30 bis 60 min inkubieren, anschließend zweimal mit TW-Puffer und einmal mit Aqua dest. spülen,
- * fluoreszenzmikroskopische Ablesung des Tests (alles oder nichts), Bestimmung des nAk-Titers nach Kärber, Umrechnung in internationale Einheiten (Grenzwert > 0,5 IU/ml).

ELISA

Für die postvakzinale Antikörperbestimmung (Hund, Katze) zur Kontrolle der Wirksamkeit der Tollwutimpfstoffe im Rahmen der Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken (998/2003/EG) werden ELISA-Ergebnisse international nicht anerkannt.

Für das Monitoring von oralen Impfkampagnen bei Wildtieren (orale Immunisierung der Füchse gegen Tollwut) können kommerzielle ELISA-Tests verwendet werden, sofern diese für derartige Zwecke validiert und in Deutschland zugelassen sind.

Anhang

Zelllinien:

Virusisolierung:

Na42/13 (Mausneuroblastomzellen)

REFIT & FAVN:

BHK 21 C13 (Baby Hamster kidney)

BHK 21-BSR/P5 88

Bezugsquelle: FLI Insel Riems, Bio-Bank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Dr. S. Reiche

Medien:

Medien Zelllinie BHK 21 C13 (BHK21-BSR/P5 88)

- *— Entsprechend der Empfehlung der Bio-Bank des FLI

Antibiotika:

- *— Amphotericin B (250 µg/ml)
- *— Penicillin (100.000 IE/l), Streptomycin (100 mg/l) oder Gentamycin (50 mg/ml)

Medien Zelllinie Na 42/13:

- *— Entsprechend der Empfehlung der Bio-Bank des FLI

Antibiotika:

- *— Penicillin (100.000 IE/l), Streptomycin (100 mg/l) oder 50 mg/l Gentamycin

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

Puffer, Lösungen, Reagenzien

Dextran-Stammlösung:	0,50 g DEAE-Dextran in 100 ml PBS (Hanks) lösen, sterilfiltrieren, ca. 4 Wochen bei 4 °C haltbar
Dextran-Gebrauchslösung:	0,2 ml Dextr.-SL in 25 ml AZM
Tollwut-Puffer:	1,72 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 0,50 g KH_2PO_4 + 7,20 g NaCl ad 1.000 ml Aqua bidest, pH 7,8
PBS (Hanks'):	9,86 g Hanks + 0,35 g NaHCO_3 ad 1.000 ml Aqua bidest, pH 7,2
Isotonischer Phosphatpuffer:	8,28 g NaCl + 3,30 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ad 1.000 ml Aqua bidest
(IP)	pH 7,8
IP-Glycerol:	IP - Glycerol = 9 : 1
Anti-Tollwutkonjugate:	siehe Liste der zugelassenen Mittel bzw. der freigegeben Chargen (https://www.fli.de/de/service/zulassungsstelle-des-fli/)
PBS (1x):	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 g KH_2PO_4 ad 1.000 ml Aqua bidest
PFA 3 %:	30 g Paraformaldehyd ad 1.000 ml PBS

Literatur

- OIE WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. (2018), Chapter 3.1.17. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses), Paris, (NB: Version adopted in May 2018).
- Fischer, M., Freuling, C. M., Müller, T., Wegelt, A., Kooi, E. A., Rasmussen, T. B., Voller, K., Marston, D. A., Fooks, A. R., Beer, M. & Hoffmann, B. (2014). Molecular double-check strategy for the identification and characterization of European Lyssaviruses. *J Virol Methods* 203, 23-32.
- Hayman, D. T. S., Banyard, A. C., Wakeley, P. R., Harkess, G., Marston, D., Wood, J. L. N., Cunningham, A. A. & Fooks, A. R. (2011). A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. *J Virol Methods* 177, 87-93.
- Hoffmann, B., Freuling, C. M., Wakeley, P. R., Rasmussen, T. B., Leech, S., Fooks, A. R., Beer, M. & Müller, T. (2010). Improved Safety for Molecular Diagnosis of Classical Rabies Viruses by Use of a TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR "Double Check" Strategy. *J Clin Microbiol* 48, 3970-3978.
- Wakeley, P. R., Johnson, N., McElhinney, L. M., Marston, D., Sawyer, J. & Fooks, A. R. (2005). Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J Clin Microbiol* 43, 2786-2792.
- Cliquet, F., Aubert, M., Sagne, L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immun Methods* 212 (1), 79-87.
- Gigante, C. M., Dettinger, L., Powell, J. W., Seiders, M., Condori, R.E.C., Griesser, R., Okogi, K., Carlos, M., Pesko, K., Breckenridge, M., Simon, E. M. M., Chu, Myjv, Davis, A. D., Brunt, S. J., Orciari, L., Yager, P., Carson, W. C., Hartloge, C., Saliki, J. T., Sanchez, S., Deldari, M., Hsieh, K., Wadhwa, A., Wilkins, K., Peredo, V. Y., Rabideau, P., Gruhn, N., Cadet, R., Isloor, S., Nath, S. S., Joseph, T., Gao, J., Wallace, R., Reynolds, M., Olson, V. A., Li, Y. (2018). Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for post-mortem rabies diagnostics. *PLoS One* 13 (5), e0197074.
- Moore, S., Gilbert, A., Vos, A., Freuling, C. M., Ellis, C., Kliemt, J., Müller, T. (2017). Rabies Virus Antibodies from Oral Vaccination as a Correlate of Protection against Lethal Infection in Wildlife. *Trop Med Infect Dis* 2 (31).

Falldefinition - Tollwut; Tollwutvirus

Klinisches Bild

Tollwutviren gehören zum Genus *Lyssavirus* aus der Familie der *Rhabdoviridae*. Gegenwärtig werden 18 verschiedenen Spezies von Tollwutviren unterschieden. Für Deutschland sind das klassische Tollwutvirus (Rabies Virus, RABV), die European Bat Lyssaviren (EBLV) -1 und -2 sowie das Bokeloh Bat Lyssavirus (BBLV) relevant. Klinisches Bild einer klassischen Tollwut, definiert als rasende oder stille Wut bei mindestens einem der folgenden Kriterien:

Bei rasender Wut: Wesensveränderungen, Hypersensibilität, Aggressivität, Paralyse, Lähmungen, Speicheln, Unterkieferlähmung, Erstickungsanfälle, Festliegen.

Bei stiller Wut: Anfangssymptome gehen schnell in Lähmungen über ohne Anzeichen von Hypersensibilität und Aggressivität, Krämpfe. Beim Menschen sind Hyperaktivität, Halluzinationen, Hyperventilation, Hyper-salivation, Konvulsionen und Hydrophobie charakteristisch. Bei Fledermäusen hauptsächlich Lähmungen und Orientierungslosigkeit.

Inkubationszeit: variabel! Drei Wochen bis mehrere Monate.

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

Erregernachweis:

- Antigennachweis:
 - Immunfluoreszenztest (IFT)
- Nukleinsäurenachweis
 - RT-PCR
- Virusnachweis
 - Erregerisolierung (kulturell)

Zur weiteren Charakterisierung (z. B. Sequenzierung bei importierten Tieren) ist Material an das NRL zu übersenden.

Zusatzinformation

Die amtliche Feststellung eines Tollwutfalles ist von der Empfehlung einer post-expositionellen Prophylaxe (PEP) im Falle einer Exposition mit einem tollwutverdächtigen Tier anhand diagnostischer Befunde zu unterscheiden.

Vorgehen bei humaner Exposition:

Im Falle einer humanen Exposition mit einem tollwutverdächtigen Tier kann mit hinreichender Sicherheit das Vorliegen einer Tollwutinfektion des betreffenden Tieres ausgeschlossen werden, wenn mindestens zwei der oben genannten Erregernachweisverfahren eindeutig negative Ergebnisse geliefert haben. Somit ergibt

sich aus diagnostischer Sicht keine Veranlassung, eine PEP zu empfehlen, wobei die letztendliche Entscheidung bei den Gesundheitsbehörden bzw. dem behandelnden Arzt liegt. Ist einer von zwei Tests positiv, erhärtet dies den Tollwutverdacht sowie die Veranlassung, eine PEP zu empfehlen.

Falldeklaration: Gemäß TW-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. Oktober 2010 ist für die amtliche Feststellung eines Tollwutfalles immer der Antigen- oder Virusnachweis maßgebend! Die Deklaration als Tollwutfall allein auf der Grundlage eines PCR-positiven Ergebnis ist nicht ausreichend.

Epidemiologischer Zusammenhang

Erwiesener epidemiologischer Zusammenhang ist grundsätzlich mit oben genannten Methoden zu bestätigen bzw. abzusichern.

Voraussetzung für den Verdacht

- Vorliegen klinischer Symptome oder
- Vorliegen pathologisch-anatomischer bzw. histologischer Hinweise sowie Beziehung zu einem bestätigten Tollwutfall oder Tollwutgeschehen
- Genomnachweis (RT-PCR)

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzung für die Feststellung eines Falles:

Virologischer Nachweis (Virusisolierung, Antigennachweis oder Genomnachweis; letzterer in Verbindung mit epidemiologischem Zusammenhang).

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

EU-Recht

- 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“) (Text von Bedeutung für den EWR) in Verbindung mit
- 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 (Text von Bedeutung für den EWR) (Text von Bedeutung für den EWR)
- Durchführungsverordnung (EU) 2021/620 der Kommission vom 15. April 2021 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Genehmigung des Status „seuchenfrei“ und des Status der Nichtimpfung für bestimmte Mitgliedstaaten oder Zonen oder Kompartimente dieser Mitgliedstaaten in Bezug auf bestimmte gelistete Seuchen und der Genehmigung von Tilgungsprogrammen für diese gelisteten Seuchen (Text von Bedeutung für den EWR)

Tollwut (Infektionen mit Lyssaviren)

- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- 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
- VERORDNUNG (EU) Nr. 576/2013 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 12. Juni 2013 über die Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 998/2003

Deutsches Recht

- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung.
- Tollwut-Verordnung in der jeweils gültigen Fassung

Andere Rechtsgrundlagen

- Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE WOAH): Chapter 8.14. Infection with rabies virus. In: OIE WOAH Terrestrial Animal Health Code, Paris, 2018. Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE): Chapter 3.1.17. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris, (NB: Version adopted in May 2018).
- Weltorganisation für Tiergesundheit (WOAH): Chapter 3.1.18. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris
- VERORDNUNG (EG) Nr. 998/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 26. Mai 2003 über die Veterinärbedingungen für die Verbringung von Heimtieren zu anderen als Handelszwecken und zur Änderung der Richtlinie 92/65/EWG des Rates.
- 2000/258/EG: Entscheidung des Rates vom 20. März 2000 zur Bestimmung eines spezifischen Instituts, das für die Aufstellung der Kriterien für die Normung der serologischen Tests zur Kontrolle der Wirksamkeit der Tollwutimpfstoffe verantwortlich ist, Amtsblatt Nr. L 079 vom 30/03/2000 S. 0040 – 0042.

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.de