

Amtliche Methodensammlung

Afrikanische Schweinepest

- 1. Charakterisierung der Infektion**
- 2. Untersuchungsmaterial**
- 3. Untersuchungsgang**
- 4. Literatur**

Afrikanische Schweinepest

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Erreger der Afrikanischen Schweinepest (ASP) ist ein großes, komplexes DNA Virus aus dem Genus *Asfivirus* der Familie *Asfarviridae* (ASFAR = African Swine Fever And Related Viruses). Das ASP-Virus (ASPV) besitzt einen Lederzeckenvektor (Zecken des Genus *Ornithodoros*) und ist damit das bisher einzige DNA Virus, das als Arbovirus (arthropod borne virus) klassifiziert werden kann.

1.2 Klinische Symptomatik

Die ASP ist eine hochkontagiöse Infektionskrankheit der Haus- und Wildschweine, die mit einem sehr variablen klinischen Bild einhergehen kann. Abhängig von der Virulenz des Virus und diversen Wirtsfaktoren, werden perakute bis chronische Verläufe beobachtet. Klinisch ist die ASP nicht von der klassischen Schweinepest (KSP) zu unterscheiden! Aus diesem Grunde ist eine labordiagnostische Abklärung zwingend erforderlich. Es stehen sowohl direkte Verfahren zum Nachweis des Erregers als auch indirekte Verfahren zum Antikörpernachweis zu Verfügung.

Anfang des Jahres 2014 meldeten sowohl Litauen als auch Polen den Nachweis von ASP-Virus in Wildschweinen in der Grenzregion zu Weißrussland, wo im Juni 2013 ein Ausbruch der ASP in Hausschweinen aufgetreten war. Ende Juni 2014 meldete auch Lettland ASP-Fälle im Schwarzwild und Ausbrüche in nicht-kommerziellen Schweinehaltungen. Die genannten Fälle stehen damit in Verbindung mit dem seit 2007 andauernden Seuchengeschehen in der Russischen Föderation und den benachbarten Staaten. Auch in Afrika ist eine deutliche Ausbreitungstendenz zu beobachten.

Die Verfütterung von Speiseabfällen und unzureichend desinfizierte Schweinetransporter, die aus betroffenen Gebieten zurückkehren, sind in diesem Zusammenhang besondere Risikofaktoren für die Einschleppung. Generell sind jedoch auch lebende Schweine (inklusive Wildschweine), Sperma sowie tierische Erzeugnisse und Rohstoffe als Einschleppungswege denkbar. Direkte und indirekte Kontakte können in die Übertragung eingebunden sein.

Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 7 Tagen (die im EU-Recht angenommene maximale Inkubationszeit beträgt 45 Tage) entwickeln die betroffenen Tiere hohes Fieber und schwere, unspezifische Allgemeinsymptome (Futtermittelverweigerung, Mattigkeit, Bindehautentzündungen, Bewegungsstörungen, Diarrhoe, stark erhöhte Atemfrequenz). Trächtige Sauen können verferkeln. Bei akuten Verläufen kann es zur Ausprägung hämorrhagischer Symptome kommen (Petechien in Haut und Schleimhaut, Nasenbluten, blutige Diarrhoe). Die aktuell in Europa kursierenden Viren sind hoch virulent und verursachen ein schweres, nahezu altersunabhängiges, unspezifisches Krankheitsbild, das nach 7 bis 10 Tagen mit dem Tod des Tieres endet (Mortalität nahezu 100 %).

Die Virusausscheidung beginnt bei den betroffenen Schweinen in der Regel am 2. bis 4. Tag nach der Infektion und dauert über längere Zeit (in der Literatur sind 12 Monate genannt) bzw. bis zum Tod des Tieres an. Nach akut-letalen Verläufen sind selten Antikörper nachweisbar; bei subakuten, chronischen oder transienten Verläufen sind ca. 7 bis 10 Tage nach der Infektion Antikörper nachweisbar. Gegen die ASP gibt es bislang keinen Impfstoff.

1.3 Differentialdiagnose

Neben der KSP gehören bakterielle Septikämien, Circovirusinfektionen und die Aujeszky'sche Krankheit zu den vorrangigen Differentialdiagnosen. Aufgrund des variablen klinischen Bildes kommen jedoch auch viele andere Erkrankungen viraler, bakterieller und nicht-infektiöser Genese in Frage.

1.4 Diagnostische Indikation

Gemäß Schweinepest-Verordnung.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 038351 7-0

Die zum Zwecke der Ausschlussdiagnostik bzw. im Rahmen des Schwarzwildmonitorings durchgeführten Untersuchungen bleiben davon unberührt.

1.6 Rechtsgrundlagen

- Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung
- Richtlinie 2002/60/EG sowie
- Entscheidung 2003/422/EG (Diagnostik-Handbuch)

2. Untersuchungsmaterial

Für die Probennahme ist die Entscheidung 2003/422/EG (Diagnostik-Handbuch) maßgeblich. Die folgenden Ausführungen dienen daher nur der Erläuterung bzw. Konkretisierung des Vorgehens in Deutschland.

In Deutschland kann ein ASP-Verdacht, außer bei Hinweisen auf Kontakt mit Tieren, Personen oder Erzeugnissen aus ASP-verseuchten Gebieten (z. B. Russland, Sardinien, Afrika), dann entstehen, wenn bei klinischen und pathologisch-anatomischen Hinweisen auf Schweinepest der Verdacht auf die klassische

Afrikanische Schweinepest

Schweinepest im Labor nicht bestätigt werden kann. Insofern ist bei Verdacht auf Schweinepest in bisher nicht betroffenen Regionen auch daran zu denken, dass eine Untersuchung auf ASP notwendig werden könnte. Es ist daher zu empfehlen, geeignetes Probenmaterial gekühlt bei +4 °C auch für eine ASP-Untersuchung zurückzuhalten. Falls ein Bestand mit unklarem Krankheitsbild, bei dem eine Untersuchung auf ASP in Frage kommen könnte, getötet und unschädlich beseitigt wird, sollten geeignete Proben gekühlt sichergestellt werden.

Die Probenverpackung muss den ADR-Vorschriften entsprechen, auf jeden Fall aber flüssigkeitsdicht sein und äußerlich gut desinfiziert werden (z. B. mit 2 % NaOH). Sie darf außerhalb des zuständigen Labors nicht mehr geöffnet werden. Frische Proben sind gekühlt, aber nicht gefroren zu versenden (Hinweis: Falls nur gefroren aufbewahrte Proben zur Verfügung stehen, sind diese im Ausnahmefall einzusenden, da viele Nachweisverfahren mit gewissen Einschränkungen auch bei gefrorenen Proben anwendbar wären).

Proben sind nach Möglichkeit per Kurier zum Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems zu schicken. Sie sind in jedem Fall telefonisch anzukündigen (038351 7-0).

Bei einem ASP-Verdacht sind einzusenden:

- Serum (möglichst 5 ml je Tier)
- wo möglich, zusätzlich 10 ml EDTA-Blut.

Hinweis: Empfohlen werden wassergefüllte Kühlakkus, die zu einer Temperatur von etwas über 0 °C führen; CO₂-Trockeneis ist nicht zu verwenden.

Aus Untersuchungseinrichtungen oder von Schlachthöfen:

- Serum, 1 - 2 ml
- Lymphknoten, insbesondere der inneren Organe sowie Mandibular- und Retropharyngeallymphknoten
- Milz, Tonsillen, Lunge, Niere
- zusätzlich möglich: ungeöffnetes Brustbein.

Blutproben sind von einer größeren Zahl von Tieren einzusenden. Das Diagnostik-Handbuch enthält Festlegungen hierzu und auch zur Untersuchung klinisch unauffälliger Kontaktbestände.

Organproben sind möglichst von ausgewählten klinisch kranken bzw. pathologisch auffälligen Tieren einzusenden. Zu den Organproben ist ein Vorbericht über das Tier (Klinik, Pathologie) zu übermitteln.

Bevorzugte Proben von Schwarzwild:

- Serum
- Milz.

Afrikanische Schweinepest

Für die Untersuchung von Fallwild im Rahmen der passiven Surveillance in freien Gebieten (siehe KSP) eignen sich alternativ in Blut bzw. bluthaltige Körperflüssigkeit getauchte Tupfer (trockene Tupfer, z.B. Genotubes).

Im Falle stark verwesener Tierkörper können Knochen, die die Entnahme von Knochenmark gestatten, eingeschickt werden.

Läsionen, die in der pathologisch-anatomischen Untersuchung betroffener Tiere bzw. beim Aufbrechen von Schwarzwild auffallen können:

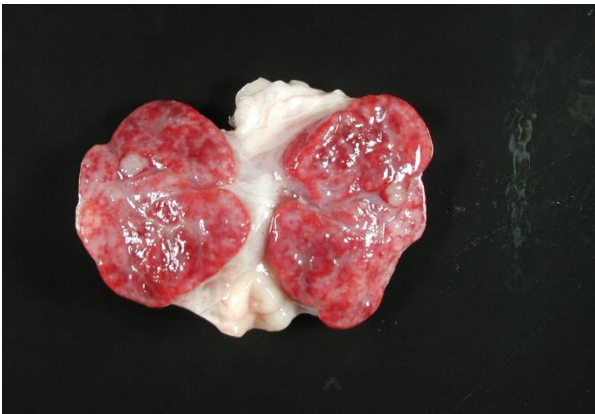


Abbildung 1: Diffuse Blutungen im Mandibularlymphknoten



Abbildung 2: Petechien in der Niere



Abbildung 3: Splenomegalie

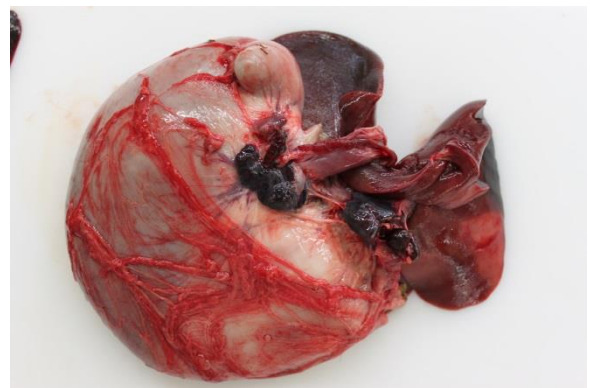


Abbildung 4: Ebenholzfarbene gastro-hepatische Lymphknoten

Afrikanische Schweinepest

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)

Zusätzliche Angaben, soweit möglich:

- Wie groß ist der Bestand? Tierarten?
- Art des Bestandes (Zucht-, Mast-, Händlerbestand etc.)?
- Bestehen Kontakte zu ASPV-verseuchten Gebieten?
- Bemerkungen und weitere Hinweise auf eine mögliche Erregereinschleppung.

3. Untersuchungsgang

(IM VERDACHTS- UND AUSBRUCHSFALL NUR DURCH FLI DURCHZUFÜHREN)

Für die Untersuchung ist die Entscheidung 2003/422/EG (Diagnostik-Handbuch) maßgeblich. Die folgenden Ausführungen dienen daher nur der Erläuterung bzw. Konkretisierung des Vorgehens in Deutschland.

Eine ASPV-Infektion wird am FLI, Insel Riems, diagnostiziert durch den Nachweis von

- ASPV-Genom in Organen, Blut oder Leukozytenkulturen
- infektiösem ASPV aus Organen oder Blut/Serum
- ggf. ASPV Antigen in Organen, Blut oder Leukozytenkulturen
- ASPV-spezifischen Antikörpern.

3.1 Nukleinsäurenachweis in der real-time PCR:

Der Nachweis von ASPV-Genom erfolgt primär über das von King et al. publizierte, OIE gelistete real-time PCR-Protokoll [1]. Es dient dem sensitiven Nachweis von ASPV-Genom in Blut-, Serum- und Organproben sowie Zellkulturüberständen. Es integriert die Amplifizierung eines internen Kontrollsystems (IC2 DNA) im duplex Assay. Kleine Fragmente viraler DNA werden durch die PCR zu nachweisbaren Mengen amplifiziert und über eine fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonde nachgewiesen. Die PCR eignet sich auch für Materialien, die für die Virusisolierung bzw. den Antigennachweis nicht mehr geeignet sind.

Zeitaufwand für die initiale Testung: ca. 1 Tag; positive Ergebnisse sind in einer zweiten, unabhängigen PCR zu überprüfen bzw. durch Sequenzierung des PCR-Produktes abzusichern.

Für die Bestätigung werden am FLI die Protokolle nach Tignon et al. und Zsak et al. verwendet [2, 3]. Das Protokoll nach King wurde zur Ausschlussdiagnostik an die Untersuchungseinrichtungen der Länder abgegeben.

3.2 Virusisolierung in Makrophagen-/Leukozytenkulturen

Die Anzucht von ASPV erfolgt primär als Hämadsorptionstest. Er dient dem Nachweis von vermehrungsfähigem ASPV aus Blut-, Gewebe- und Tupferproben in primären Blutmonozyten (PBMCs) bzw. daraus generierten Makrophagenkulturen. Es handelt sich um einen Bestätigungstest, der insbesondere im Ausbruchsfall zum Einsatz kommt, und im OIE Manual beschrieben ist. Der Test ist bei entsprechender Erfahrung hoch sensitiv, ist jedoch nicht für alle ASPV Isolate aussagekräftig, kann durch bestehende Antikörperreaktionen behindert werden und muss daher von anderen Testsystemen begleitet werden.

Der Test macht sich den Umstand zunutze, dass es in ASPV-infizierten Leukozytenkulturen zu einer Hämadsorptionsreaktion kommt, d.h. Erythrozyten lagern sich rosettenartig um infizierte Leukozyten („Himbeeren“). Circa 48 Stunden nach dem Auftreten der Hämadsorption kommt es zur Lyse der infizierten Zellen. Da kein anderes für Schweine relevantes Virus dieses Phänomen auszulösen vermag, ist der Test als spezifisch für ASPV anzusehen.

Blut-, Gewebe- oder Tupferproben von Schweinen werden nach entsprechender Aufbereitung auf primäre Blutleukozytenkulturen verimpft. Die infizierten Kulturen sind über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen täglich abzulesen. Im positiven Falle kommt es zu der spezifischen Rosettenbildung (siehe Abbildung 5). Im Regelfall werden mindestens zwei Passagen angesetzt.

Zeitaufwand:

1. Passage 7 Tage (im klar positiven Falle ca. 2 Tage),
2. Passage ca. 7 weitere Tage.

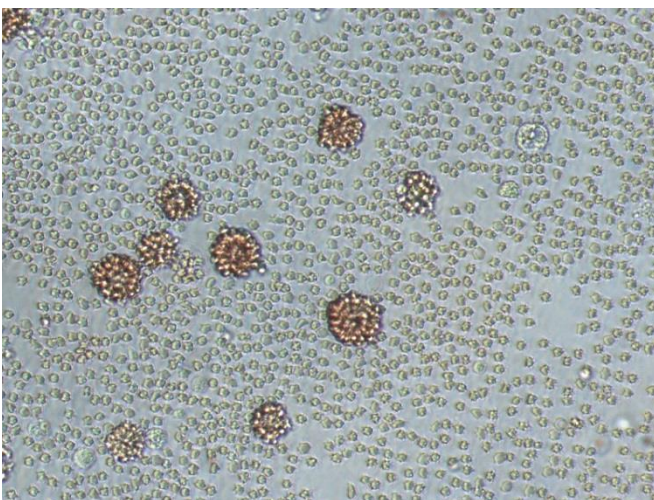


Abbildung 5: Positiver Hämadsorptionstest 48 Stunden nach Inokulation eines positiven Serums

Afrikanische Schweinepest

3.3 Nachweis von ASPV-Antigen

Für den Nachweis von ASPV-Antigen steht ein kommerzieller ELISA zur Verfügung, der jedoch nur in Ausnahmefällen zum Einsatz kommt.

In Kryoschnitten bzw. Milzabklatschpräparaten kann virales Antigen mittels Immunfluoreszenz- oder Immunperoxidasefärbung nachgewiesen werden.

Zeitaufwand: ca. 1 Tag

3.4 Nachweis ASPV-spezifischer Antikörper

Für die serologische Diagnostik der ASP stehen in Kürze zwei zugelassene kommerzielle ELISA-Systeme zur Verfügung (die fachliche Prüfung ist abgeschlossen, die formelle Zulassung erfolgt zeitnah). Die Testsysteme bedienen sich verschiedener Antigene und werden daher parallel eingesetzt. Neben einem Blocking ELISA auf der Basis des p72 (INGEZIM PPA COMPAC, Ingenasa), ist ein indirektes Testsystem verfügbar, das sich einer Antigenmischung aus p72, p62 und p32 (ID Screen® African Swine Fever Indirect ELISA, IDvet) bedient.

Zeitaufwand: ca. 1 Tag

Zur Bestätigung stehen Immunoblot- bzw. indirekte Immunperoxidase-Tests zur Verfügung.

Zusätzlicher Zeitaufwand: 1-2 Tage

4. Literatur

1. King, D.P., et al., *Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus*. J Virol Methods, 2003. **107**(1): p. 53-61.
2. Tignon, M., et al., *Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus*. J Virol Methods, 2011. **178**(1-2): p. 161-70.
3. Zsak, L., et al., *Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 112-9.

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