

Amtliche Methodensammlung, Stand April 2010

Aujeszky'sche Krankheit (AK)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1. Erreger

Das Virus der Aujeszky'schen Krankheit (Synonym Pseudorabiesvirus, PrV) gehört zur Familie der Herpesviridae, Subfamilie Alphaherpesvirinae und wird laut derzeit gültiger Taxonomie als Suid Herpesvirus 1 (SHV1) bezeichnet. Das Wirtsspektrum umfasst nahezu alle Säugetierarten; lediglich die Primaten und Einhufer weisen hohe natürliche Resistenzen auf. Als Hauptreservoir ist das Hausschwein (aber auch Schwarzwild) anzusehen, wobei die Empfänglichkeit bei diesen Tierarten stark vom Lebensalter und von der Virulenz des Erregers abhängt.

1.2. Klinische Symptomatik

Die Inkubationszeit liegt in der Regel zwischen 1 bis 8 Tagen, in Abhängigkeit von der Infektionsdosis auch bis zu 3 Wochen. Die Pathogenität bzw. Virulenz des Erregers und die unterschiedlichen pathogenetischen Eigenheiten bestimmen die Krankheitserscheinungen bei den einzelnen Tierarten. Die klinischen Symptome beim Schwein variieren in Abhängigkeit des Lebensalters. Bei juvenilen Tieren überwiegen durch Meningoencephalitis und Virämie bestimmte Symptome (Appetitlosigkeit, Erbrechen, Mattigkeit, starker Durst, Lähmungserscheinungen, Krampfzuckungen, unphysiologische Bewegungen). Bei Adulten sind die klinischen Erscheinungen meist mild; innerhalb weniger Tage tritt Rekonvaleszenz ein (stumme Durchseuchung). In Mastbetrieben kommt es infolge der Sekundärinfektionen zu schweren katarrhalischen oder kruppösen Pneumonien.

Bei den übrigen Tierarten stehen ausschließlich durch den Neurotropismus verursachte Symptome im Vordergrund (Reizungs-, Lähmungs-, vegetative Schockform), die innerhalb weniger Stunden bis Tage zum Tod führen. Das charakteristischste Symptom ist der akute Juckreiz (fehlt beim Schwein!).

1.3. Differentialdiagnostik

Als Differentialdiagnose sind beim Schwein hauptsächlich Coli-Enterotoxikose, Kochsalzvergiftung, ESP, Teschener Krankheit, sonstige Meningoencephaliden, Schweineinfluenza und Pasteurellose in Betracht zu ziehen. Bei allen anderen Tierarten spielen die Tollwut und Vergiftungen die größte Rolle (Beer, J., Infektionskrankheiten der Haustiere, 1987, Gustav Fischer Verlag Jena, 881 pp).

1.4. Diagnostische Indikation

- Tierverkehr (Tierhandel, Ausstellungen)
- klinischer oder epidemiologisch begründeter Verdacht
- Untersuchungen im Zuge von Anerkennungsverfahren und zum Nachweis der Seuchenfreiheit
- Quarantäne

1.5. Zuständige Untersuchungseinrichtungen

- Veterinäruntersuchungs-, Tiergesundheitsämter bzw. Staatliche Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsämter der Bundesländer
- Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie, Seestr. 55, 16868 Wusterhausen (nationales Referenzzentrum für Aujeszkysche Krankheit), Tel. 033979 80-0.

1.6. Rechtsgrundlagen

- Verordnung zum Schutz gegen die Aujeszkysche Krankheit vom 5. November 1993
- Richtlinie 64/432/EWG des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen/* KODIFIZIERTE FASSUNG CF 375Y0820(01) */
- 93/24/EWG: Entscheidung der Kommission vom 11. Dezember 1992 über ergänzende Garantien hinsichtlich der Aujeszky-Krankheit für Schweine, die für seuchenfreie Mitgliedstaaten oder Regionen bestimmt sind *Amtsblatt Nr. L 016 vom 25/01/1993 S. 0018 – 0021*
- 93/244/EWG: Entscheidung der Kommission vom 2. April 1993 über ergänzende Garantien hinsichtlich der Aujeszky-Krankheit für Schweine, die für bestimmte Teile des Gemeinschaftsgebiets bestimmt sind *Amtsblatt Nr. L 111 vom 05/05/1993 S. 0021 – 0024*

1.7. Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles

Positiver Erregernachweis	Virusisolierung	Zellkultur
	Antigennachweis	IFT
Klinischer Verdacht in Verbindung mit Antikörpernachweis (ELISA, NT)		
Beim Rind: Klinischer Verdacht in Verbindung mit histologischem Befund		

2. Untersuchungsmaterial

Untersuchungsmaterial Erregernachweis

Nasen-, Rachen- und Genitalupfer; Organmaterial wie Gehirn, Lunge, Tonsille (Menge: ca. 1 cm³) bei verendeten bzw. geschlachteten Tieren, bei Saugferkeln evtl. auch Milz. Lagerung bei -20 °C, optimal bei -80 °C. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen führt zur drastischen Senkung des Virustiters und damit der Nachweisbarkeit in der Zellkultur.

Untersuchungsmaterial Antikörpernachweis

Nativblutproben, Seren; Menge: mindestens 500 µl

3. Untersuchungsgang

3.1. Erregernachweis

Antigennachweis mittels direkter Immunfluoreszenz (IFT)

- Herstellung von Kryostatschnitten auf fettfreien Objektträgern,
- Fixierung der Kryostatschnitte in Azeton für 10 bis 15 min bei ca. -20 °C,
- Spülen in isotonischem Phosphatpuffer (IP) oder PBS, pH 7,2, für 5 min,
- Inkubation mit Konjugat in Arbeitsverdünnung bei 37 °C (Dauer nach Produktinformation des Herstellers, Anti-PrV AV Gamakon B),
- dreimal Spülen in IP für insgesamt 10 min, kurzes Spülen in Aqua dest, lufttrocknen,
- Eindecken der Präparate in IP-Glycerol (9/1)
- IF-Mikroskopie bei 200-facher Vergrößerung unter Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen

Virusisolierung in der Zellkultur

Das PrV vermehrt sich in Zellkulturen verschiedenster Herkunft mit charakteristischem cythopathogenem Effekt (CPE); am geeignetsten sind African Green Monkey (Vero)-Zellen.

Folgende Methode hat sich bewährt:

Virusisolierung

- Homogenisieren des Organmaterials, Herstellen einer Organsuspension (1:5 bis 1:10) unter Verwendung antibiotika- bzw. antimykotikahaltigen Mediums (Anlage), Lagerung für 1 bis 2 h bei 4 °C im Kühlschrank, anschließende Zentrifugation.
- Inokulation des Überstandes auf die entsprechende Zellkultur (z. B. Vero, ML [mink lung]); zur Virusisolierung können 24-Lochplatten, Zellkulturröhrchen oder Zellkulturflaschen verwendet werden, das Zellkulturmedium sollte zur Verhinderung bakterieller Kontaminationen Antibiotika und Antimykotika in gebräuchlichen Konzentrationen enthalten (Anlage), anschließende Bebrütung bei 37 °C für mindestens 7 Tage.
- tägliche Kontrolle des Auftretens eines CPE (bei hohem Virusgehalt diffus verteilte Zellabkugelungen nach ca. 1 bis 2 d, bei niedrigem Virusgehalt Entstehung von Synzytien oder einzelnen Plaques)
- bei latenten Infektionen kann unter Umständen eine bis zu vierfache Passagierung notwendig sein.

Identifizierung des Virus durch Immunfluoreszenz an Deckglaskulturen

- Abtrypsinieren der CPE-Zellkultur, mischen mit einer Negativpopulation (1:2),
- vorsichtiges Abspülen der Objektträger in isotonischem Phosphatpuffer (IP), pH 7,2 (oder PBS),
- Auftragen der Zellen auf fett- und fluoreszenzfreie Objektträger, lufttrocknen,
- Fixierung in Azeton für 10 min bei Raumtemperatur (RT),
- 5 min IP, RT,

- nach kurzem Lufttrocknen Einlegen der Deckgläser in eine feuchte Kammer,
 - Beschicken mit Konjugat (direkter IFT) bzw. monoklonalem Antikörper (indirekter IFT) (10 µl/Objektträger je nach Gebrauchsverdünnung)
- die weitere Bearbeitung erfolgt unterschiedlich.

Direkter IFT

Inkubation mit FITC-Anti-AKV Konjugat (AV Gamakon B) in Gebrauchsverdünnung für 1 h bei 37 °C (Gebrauchsverdünnung lt. Angaben des Herstellers)

Indirekter IFT

- Inkubation mit monoklonalem AKV-Antikörper oder AKV-HIS vom Schwein je nach Gebrauchsverdünnung für 1 h bei RT in feuchter Kammer
- zweimaliges kurzes Abspülen in IP und Einlegen in frischen Spülpuffer (IP) für mindestens 5 min
- Inkubation mit FITC-Anti-Maus IgG (Gebrauchsverdünnung lt. Hersteller) für 1 h bei RT,
- zweimaliges kurzes Abspülen in IP und Einlegen in frischen Spülpuffer für mindestens 10 min, kurzes Abspülen in Aqua dest., lufttrocknen,
- Präparate in noch leicht feuchtem Zustand auf fluoreszenzfreie Objektträger in IP-Glycerol (9/1) eindecken.

Identifizierung durch Virusneutralisationstest (siehe NT)

- Inkubation des vermeintlichen PrV-Isolates in log 10-Verdünnungen mit einem PrV-positiven and PrV-negativen Referenzserum vom Schwein für 2 h bei 37 °C,
- Inokulation des Virus-Serumgemisches auf 96-well Mikrotiterplatte (Vierfachansatz) und anschließende Bebrütung für 2 bis 3 Tage bei 37 °C,
- Kontrolle der virusneutralisierenden Aktivität

Nachweis von PrV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR kann zum Nachweis von PrV-DNA in Organproben sowie in Tupferproben genutzt werden und kann vor allem beim Nachweis latenter AK-Infektionen von Vorteil sein. Je nach Fragestellung sind in der Literatur verschiedene PCR-Techniken für die Aujeszky'sche Krankheit beschrieben. Primer und die Amplifikationsparameter müssen entsprechend der Zielstellung ausgewählt werden. Die PCR muss für die jeweiligen spezifischen Bedingungen optimiert werden, um unter Routinebedingungen erfolgreich zu funktionieren. Der hohe GC-Gehalt des PrV kann zu Schwierigkeiten führen.

Generelle Arbeitsschritte sind:

- Homogenisierung des zu untersuchenden Probenmaterials,
- Proteinase K-Verdau,
- 3x Phenol-Chloroform-Extraktion,
- anschließende Fällung der DNA mittels 3m Natriumacetat und absolutem Alkohol,
- Amplifikation
- Agarosegel-Elektrophorese

Am nationalen Referenzzentrum für die Aujeszkysche Krankheit am FLI ist eine PCR zum Nachweis viraler DNA etabliert, mit der Fragmente des gp50-Gens und des gC-Gens nachgewiesen werden [Schang, L.M. and Orsorio, F. A. (1993). A quantitative technique for the study of the latency of Aujeszký virus. Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz., 12, 505-521].

3.2. Indirekter Erregernachweis

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bezüglich der Durchführung der einzelnen ELISA-Tests wird auf die Produktinformationen der Hersteller verwiesen.

Serumneutralisationstest zur Antikörperbestimmung (SNT)

Mit dem VNT (siehe NT) wird die spezifische und unspezifische virusneutralisierende Aktivität eines Testserums gemessen.

Ausführung:

- Virusvermehrung aus Masterstockvirus (z. B. Laborstamm AK-64) auf Vero-Zellen in Zellkulturflaschen (Dichte 100.000 Zellen/ml), Virusernte nach ca. 24 bis 48 h (CPE sollte ca. 80 bis 90 % des Zellrasens erfasst haben), 3x Einfrieren-Auftauen mit anschließender Zentrifugation
- Titration des Arbeitsvirus auf Mikrotiterplatten (Vierfachansatz), Bestimmung des Virustiters nach Kärber (nach 48 h), Arbeitsvirus aliquotieren in 1 ml Portionen, Lagerung bei -80 °C
- Einstellen der Virussuspension auf 200 KID₅₀/0,1ml
- Serum von Nativblutproben (keine EDTA-Plasmaproben); Inaktivierung in Mediumverdünnung (1:2) für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad
- Serumverdünnung der Test- und Referenzseren (Positiv- Negativserum) in lg₂-Schritten in Mikrotiterplatte oder Röhrchen (100 µl)
- Zugabe eines äquivalenten Volumens (100 µl) der Virussuspension (200 KID₅₀/0,1ml), Inkubation für 2 h bei 37 °C (Inkubation für 24 h erhöht die Sensitivität des Tests)
- Inokulation eines 1 d alten Monolayers (Vero-Zellen, Dichte ca. 100.000 Zellen/ml), bei dieser Zellkonzentration soll sich nach einem Tag ein fast konfluenten Monolayer ausgebildet haben)
- Platten für 3 Tage bei 37 °C inkubieren
- mikroskopische Ablesung des Tests, Bestimmung des Ak-Titers nach Kärber (Grenzwert = 1:4).

Anhang

Zelllinien

Virusisolierung: Vero 76:

VNT

Katalognummer: 228

Bezugsquelle: Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin am FLI, Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems, Dr. Riebe

Medien

Medien für Zelllinie Vero 76:

Anzuchtmedium:

- 89 % Eagle MEM Dulbecco w/L-Glut
- 10 % Fetales Kälberserum (FKS)
- 1 % Antibiotika

Antibiotika:

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

Erhaltungsmedium:

- 96 % Eagle MEM Dulbecco w/L-Glut
- 3 % FKS
- 1 % Antibiotika

Puffer, Lösungen, Reagenzien

PBS:	8,00g NaCl + 0,2g KH ₂ PO ₄ + 2,9g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O + 0,2g KCl ad 1.000 ml Aqua bidest, pH 7,2
Isotonischer Phosphatpuffer:	8,28g NaCl + 3,30g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O ad 1.000 ml Aqua bidest
(IP)	pH 7,8
IP-Glycerol:	IP - Glycerol = 9 : 1
Anti-AKV-Konjugat:	AV - Gamakon B (Bioveta, n.p. Nitra)