



**Bundesinstitut
für gesundheitlichen Verbraucherschutz
und Veterinärmedizin**
Fachbereich Bakterielle Tierseuchen und
Bekämpfung von Zoonosen



Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für die Lungenseuche des Rindes

Angaben zur Krankheit und zum Erreger

Die Lungenseuche des Rindes, auch als infektiöse Pleuropneumonie der Rinder (Pleuropneumonia bovis contagiosa) bezeichnet, ist eine nach dem Tierseuchengesetz (TierSG) vom 20. Dezember 1995 (BGBl. I S. 2038, zuletzt geändert am 19. Februar 2001, BGBl. I S. 226) anzeigepflichtige, hochkontagiöse, bakterielle Infektionskrankheit des Respirationstraktes mit hoher Morbidität und Mortalität. Sie geht mit hohen wirtschaftlichen Verlusten einher.

Empfänglich sind Hausrinder aller Altersgruppen sowie Büffel, Bison, Rentier und Antilopen. Die Krankheit ist charakterisiert durch eine kruppöse Pneumonie (bunte Marmorierung der Lunge) und serofibrinöse Pleuritis. Der Verlauf ist meist subakut bis chronisch. Obwohl die Krankheit derzeit vor allem in verschiedenen Staaten Afrikas, Südamerikas und Asiens auftritt (in Europa letztmalig 1993 in Italien und 1995 in Portugal), besteht aufgrund des ausgeprägten Tierhandels und der offenen Grenzen innerhalb Europas permanente Einschleppungsgefahr, wenngleich die Gefahr für Deutschland insgesamt eher als gering einzuschätzen ist. In Deutschland wurde der letzte Fall von Rinderlungenseuche 1926 nachgewiesen. Tiere, die die Krankheit überstehen oder noch chronisch erkrankt sind, werden zu Dauerausscheidern, die eine bedeutende Infektionsquelle darstellen. Aus diesem Grunde fordern viele Länder vor Tierimporten im Rahmen der Handelsuntersuchungen einen negativen Antikörpernachweis bei der Komplementbindungsreaktion (KBR).

Die Lungenseuche des Rindes wird durch *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony Type (MmmSC) hervorgerufen. Der Erreger gehört zur Gattung *Mycoplasma* innerhalb Familie der *Mycoplasmataceae* (Klasse *Mollicutes*). Es handelt sich dabei um kleinste auf zellfreiem Medium wachsende Mikroorganismen (0,3-0,8 µm). Sie besitzen keine Zellwand und bilden auf festem Nährmedium typische spiegeleiförmige Kolonien.

Aufgaben des Referenzlabors

Wegen der vergleichsweise geringen Bedeutung der Lungenseuche für Deutschland sind im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) keine umfangreichen Forschungsvorhaben zu dieser Erkrankung vorgesehen. Die Arbeiten konzentrieren sich vor allem auf die Untersuchung von Verdachtsfällen sowie auf die Verbesserung der diagnostischen Verfahren bzw. die Erarbeitung und interne Validierung neuer diagnostischer Methoden.

Im Einzelnen sind folgende Aufgabenschwerpunkte zu nennen:

1. Unterstützung der Untersuchungsämter bei der Lösung schwieriger diagnostischer Fälle, insbesondere durch
 - kulturellen Erregernachweis und den Erregernachweis mittels PCR,

- Differenzierung von Isolaten entsprechend der gültigen Taxonomie mit Hilfe der PCR,
 - Untersuchung verdächtiger Seren mittels KBR,
 - Charakterisierung verdächtiger Seren durch Immunoblot.
2. Verbesserung der vorhandenen und Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren sowie deren interne Validierung.
 3. Verfolgung der aktuellen epidemiologischen Situation in der Welt.

Probleme beim serologischem Erregernachweis

Der Erreger ist auf Grund spezieller Anforderungen an das Nährmedium und seines langsamen Wachstums schwierig zu kultivieren. Sowohl beim direkten Erregernachweis mittels Immunfluoreszenz als auch beim serologischen Nachweis treten häufig Kreuzreaktionen auf, wodurch die Spezifität erheblich beeinträchtigt werden kann. Die Kreuzreaktionen sind auf die engen verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen MmmSC und einer Reihe anderer Spezies zurückzuführen (siehe Tabelle 1). Die aufgeführten Mycoplasmenarten bilden den sogenannten *Mycoplasma-mycoides*-Cluster und sind auf Grund einer größeren Anzahl gemeinsamer Proteinantigene mit den traditionellen Nachweismethoden oft nicht voneinander abzugrenzen.

Tabelle 1: Differentialdiagnostisch für MmmSC wichtige Mycoplasmenarten

<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> Large Colony Type (MmmLC)
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>
<i>M. Capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>
<i>M. bovine</i> group 7

Die derzeitige amtliche Lungenseuchediagnostik beruht immer noch auf der vom Internationalen Tierseuchenamt (OIE) empfohlenen Komplementbindungsreaktion (KBR). Dieses serologische Verfahren weist allerdings sowohl hinsichtlich Spezifität als auch Sensitivität entscheidende Unzulänglichkeiten auf. In der Vergangenheit gab es in Deutschland nur aufgrund von Kreuzreaktionen mit oben beschriebenen Spezies wiederholt Rinder mit positivem KBR-Titer. Dies konnte erst mittels der Immunoblottechnik nachgewiesen werden. Deshalb bietet sich dieses ebenfalls von der OIE empfohlene serologische Diagnoseverfahren an, mit dem eine wesentlich höhere Spezifität und Sensitivität erreicht werden kann. Das Prinzip besteht in der elektrophoretischen Auftrennung des Erregerantigens und der anschließenden Immobilisierung des Antigens auf einer Membran. Diese antigenbeladene Membran wird mit den zu untersuchenden Seren sowie mit den notwendigen Kontrollseren inkubiert und die Reaktionsbanden durch eine enzymatische Farbstoffreaktion sichtbar gemacht. Durch den Vergleich des entstandenen Bandenprofils mit dem des positiven Kontrollserums ist eine eindeutige Ergebnis-Aussage möglich. Beim Vorhandensein genau definierter Banden mit einem bestimmten Molekulargewicht (110, 98, 95, 62/60 und 48 kDa) handelt es sich um positive Proben.

Diese Methode sollte in all den Fällen zur Anwendung kommen, wo die KBR zuvor unklare Ergebnisse ergibt. Man erhält auf diese Weise einen präziseren Befund hinsichtlich des Vorhandenseins von Antikörpern gegen den Lungenseucheerreger.

Spezifischer Erregernachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zeichnet sich gegenüber dem kulturellen Erregernachweis mit anschließender indirekter Immunfluoreszenz sowie der biochemischen Erregercharakterisierung durch eine wesentlich höhere Schnelligkeit aus. Das Ergebnis der PCR liegt bereits nach 2 Tagen vor, wogegen man beim kulturellem Erregernachweis mit ca. 20 Tagen rechnen muss. Das spielt insbesondere nach Feststellung eines serologischen Verdachts eine wichtige Rolle, wenn bis zur entgültigen Abklärung mittels Erregernachweis entsprechende tierseuchenrechtlich notwendige Maßnahmen erforderlich werden (z. B. Bestandsperre).

Weitere Nachteile der indirekten Immunfluoreszenz und der biochemischen Charakterisierung gegenüber der PCR sind:

- subjektive Faktoren bei der Ergebnisbeurteilung (Erfahrung des Untersuchers spielt eine große Rolle)
- oftmals keine eindeutige Spezies-Zuordnung durch die Ergebnisse aus der biochemischen Untersuchungen möglich.
- falsch-positive serologische Befunde durch die Anwendung von Vakzinen
- ein frühzeitiges Erkennen von Infektionsherden auf serologischem Wege ist oft nicht möglich, da komplementbindende Antikörper erst nach ca. 10 Tagen nach Beginn der klinischen Erkrankung nachweisbar sind

Aus diesem Grund wurde im Referenzlabor eine PCR entwickelt, die ausgehend von zwei Primerpaaren eine eindeutige Erregerzuordnung ermöglicht. Es handelt sich dabei um ein spezies-spezifisches und um ein für die Klasse *Mollicutes* spezifisches Primerpaar. Als Probenmaterial für die PCR eignen sich Lungengewebe, Lungenlymphknoten, Nasentupfer, Pleuralflüssigkeit und Blut, aber auch Spermaproben und Gelenkflüssigkeit. Die PCR weist neben der hohen Spezifität auch eine sehr hohe Sensitivität auf.

Diese Methode wird den Anforderungen an ein schnelldiagnostisches Verfahren mit hoher Spezifität und Sensitivität gerecht und kommt mittlerweile zunehmend als Routineverfahren nicht nur in Speziallabors in Betracht. Sie sollte neben dem Immunoblot im Anschluß an eine KBR mit positivem oder unklarem Ergebnis durchgeführt werden.

Ablauf des Erregernachweises bei Einsendung einer Verdachtsprobe auf Lungenseuche in das Referenzlabor

- Durchführung der KBR mit Blutserum (gesetzlich vorgeschrieben),
- parallel dazu mit entsprechenden Organproben Kultur ansetzen (zuerst Bouillon-Kultur, danach auf festem Nährmedium), bei nachweisbarem Wachstum (mikroskopische Begutachtung der Agarplatte) anschließend indirekter Immunfluoreszenztest und biochemische Charakterisierung der kultivierten Bakterien,
- außerdem parallel dazu Ansatz der PCR mit den Organproben;
- bei positivem oder unklarem KBR-Ergebnis zusätzlich Immunoblot.

Ansprechpartner

Dr. Martin Heller (Leiter des Referenzlabors)

E-mail: m.heller@bgvv.de

Dr. Konrad Sachse

E-mail: k.sachse@bgvv.de

Dr. Irmgard Moser

E-mail: i.moser@bgvv.de

Falk Melzer

E-mail: f.melzer@bgvv.de

Weitere Informationen zum Erreger und zur Lungenseuche

http://www.bvet.admin.ch/tiergesundheit/d/ausbild_beratung/tierseuchen/lungenseuche_rinder/lungseucrind.html

<http://www.vetmed.uni-muenchen.de/med2/skripten/b4-11.html>

<http://www.biochem.kth.se/GenomeCenter/mycoplasma.html>

http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A060.htm

http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00027.htm

<http://www.oie.int/hs2/report.asp>