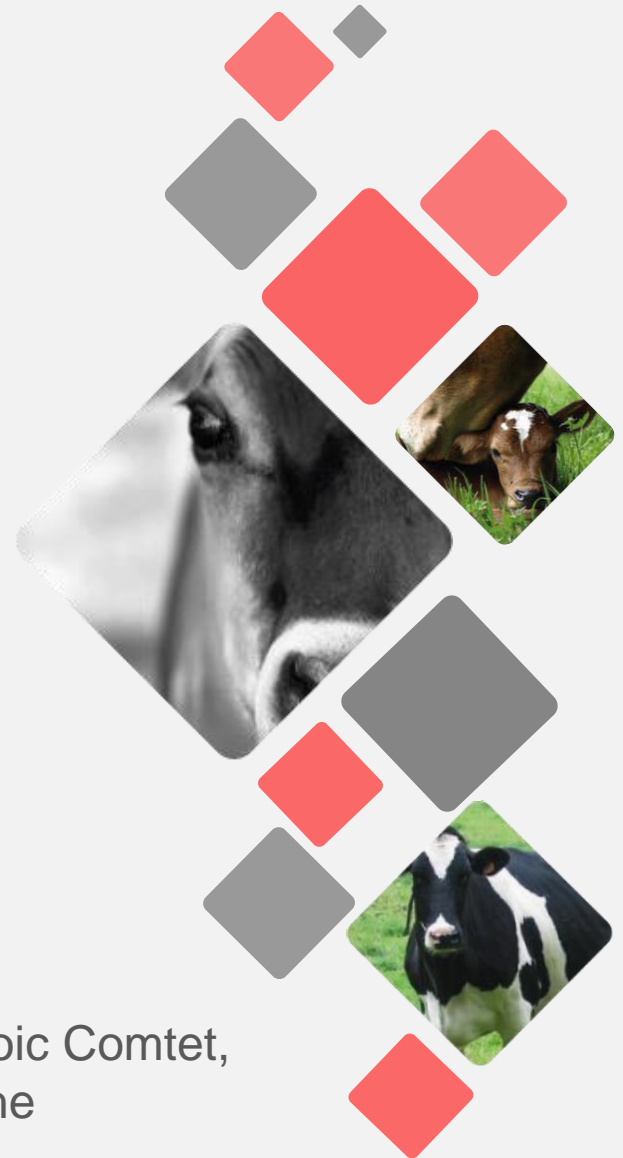


*10. Stendaler Rindersymposium
10.-12. Mai 2017*

Lumpy Skin Disease

Validierung eines neuen ELISAs
(und einer neuen qPCR Methode)
für die Diagnostik der Lumpy Skin
Krankheit





Kurzer Überblick über die Krankheit



Symptome



Verbreitung / Impfung



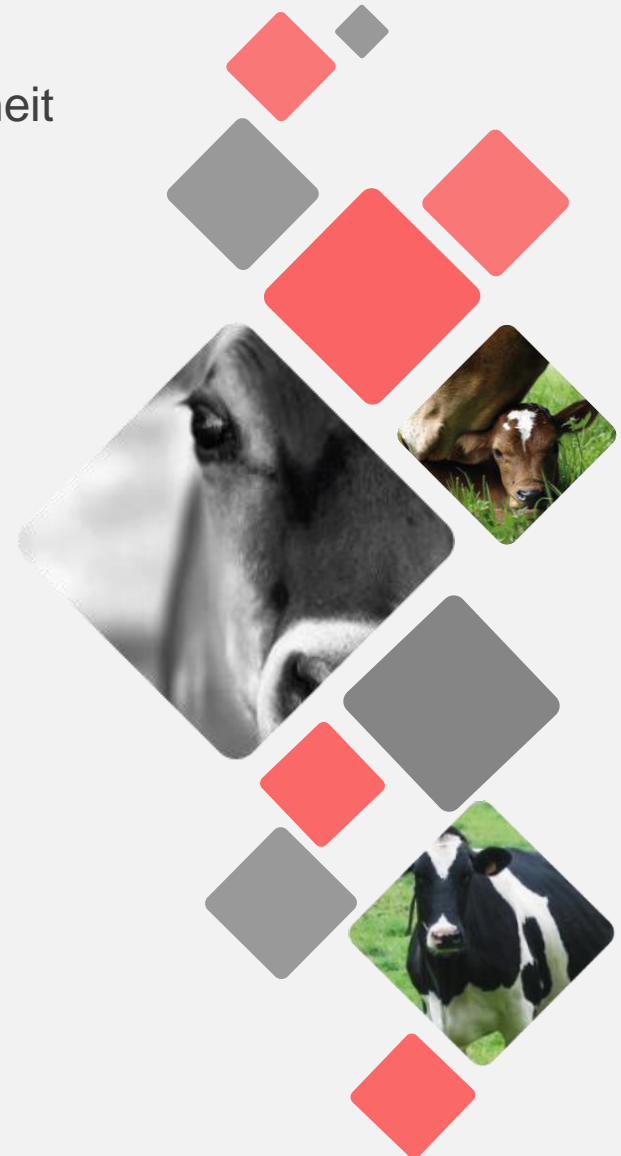
Diagnostische Methoden



ID Screen ELISA Kit



Real-Time PCR (in Entwicklung)



Lumpy-Skin-Krankheit

- ❖ Auch Dermatitis nodularis oder Knötchenkrankheit der Rinder genannt
- ❖ Hauptwirt ist das Rind (aber auch Büffel, Giraffen, Kamele und Impalas sind empfänglich)
- ❖ Anzeigepflichtige Tierseuche, OIE reguliert
- ❖ Das Lumpy Skin Disease Virus (LSDV) gehört zur Gattung Capripoxvirus (Familie Poxviridae), großes DNA Virus.
- ❖ Andere Capripoxviren : Schaf- und Ziegenpockenvirus (96% Übereinstimmung des Genoms)
- ❖ Übertragung durch über Vektoren (durch bestimmte blutsaugende Fliegen-, Mücken- oder auch Zeckenarten) sowie direkten oder indirekten Kontakt
- ❖ LSD verursacht schweren wirtschaftlichen Schaden.
- ❖ Direkte Produktionsverluste werden auf 40-60% geschätzt.
- ❖ Indirekte Verluste entstehen durch Kontroll- und Eradikationsmassnahmen und Handelsrestriktionen.

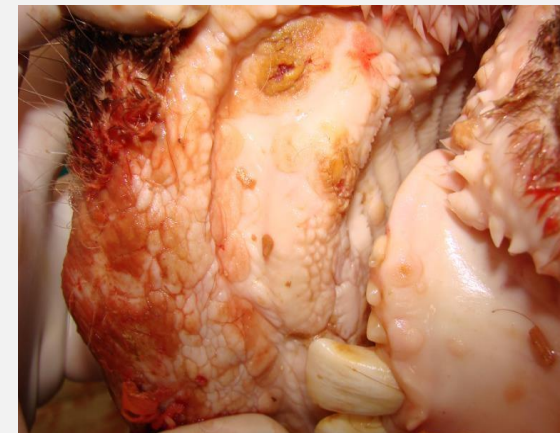
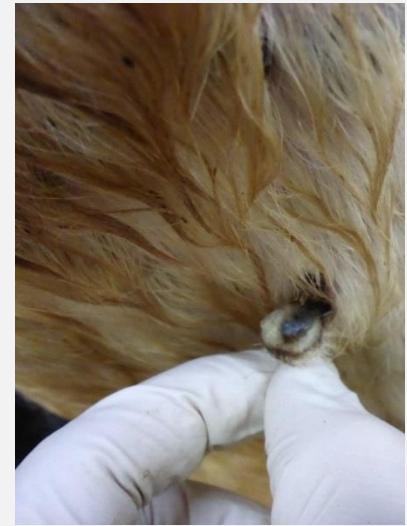


- » Hohes Fieber
- » Erhöhter Speichel- und Tränenfluss
- » Innerhalb weniger Tage bilden sich Knötchen, später Papeln und Vesikel, im Kopfbereich, in der Genitalregion und am Euter.
- » Hautläsionen von 0,5 - 5 cm Durchmesser
- » Geschwollenen Beine und Lahmheit
- » Morbidität sehr variabel (5 - 45%), Mortalität meist <10%



Symptome

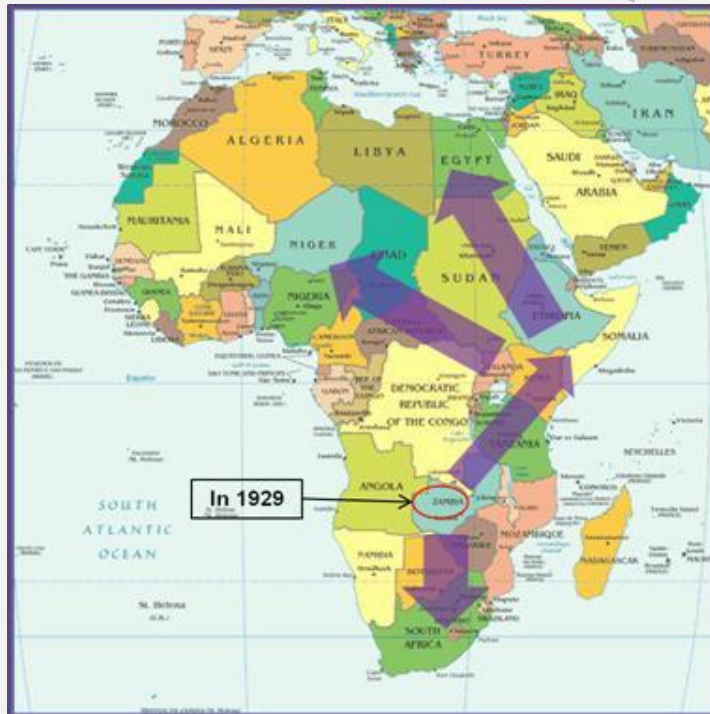
Fotos : Bernd HOFFMANN, FLI



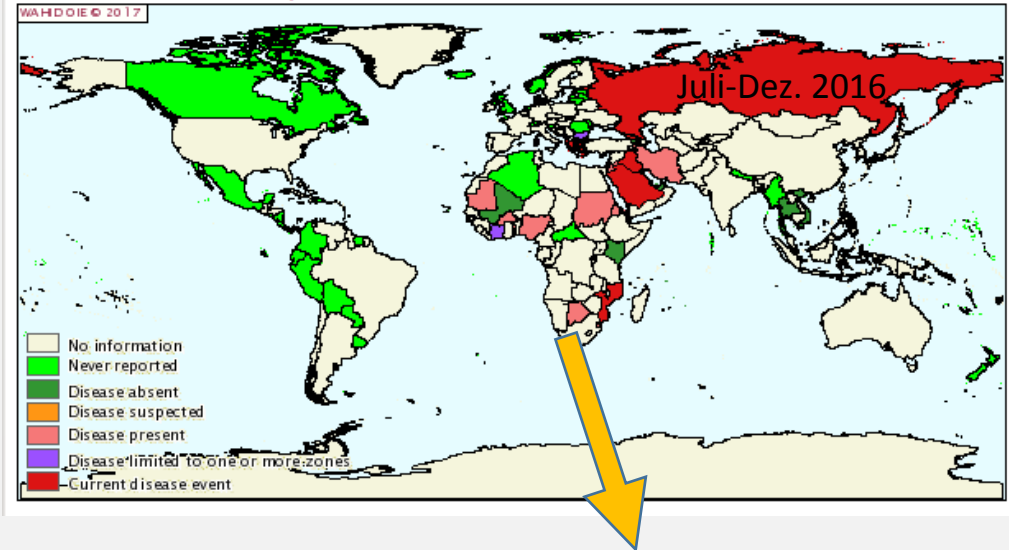
Quelle : Eeva TUPPURAINEN

Verbreitung

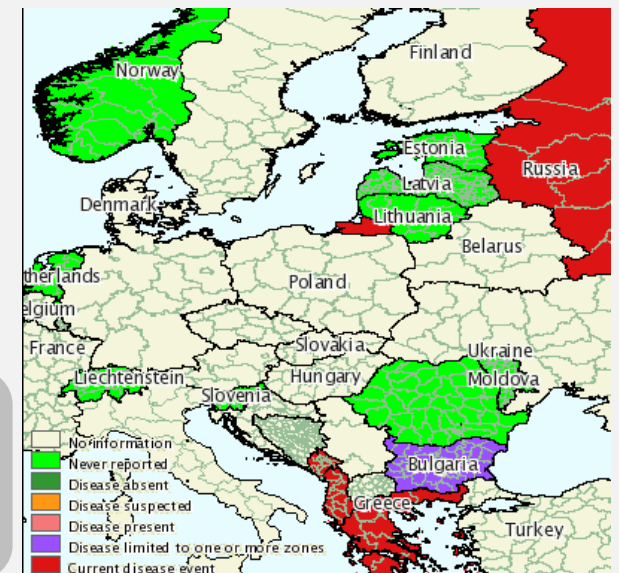
Erste Beschreibung in Zambia 1929
Endemisch in vielen afrikanischen Regionen



Disease distribution maps



→ Ausbreitung in Richtung Nord-Osten
→ Seit 2015 gibt es einen massiven Seuchenzug auch in Europa
(erst Griechenland, dann Bulgarien, Mazedonien, Serbien, Kosovo, Albanien, ...)



Immunität, Bekämpfung und Impfung

- ❖ Lebenslange Immunität nach Feldinfektion (Kreuzimmunität für alle Capripoxviren, bovine, ovine und caprine Stämme), aber unwahrscheinlich nach Impfung
- ❖ Schutz hauptsächlich durch zelluläre Immunität, aber auch Antikörperbildung
- ❖ *Bisherige Information : Antikörper können bis ca. 3 Monate nach einer Infektion nachgewiesen werden.*
- ❖ Bekämpfung durch aktive Überwachung (Klinik + Probennahme), großflächige Impfung sowie Vektorkontrolle
- ❖ Impfstoffe → attenuierte Lebendvakzine, aktuell nicht in Deutschland zugelassen

- ▶ "LSD Vaccine" für Rinder (Onderstepoort Biological Products, SA, Neethling Stamm)
- ▶ Lumpyvax – Merck, Intervet, SA (attenuierter Feldstamm)
- ▶ Herbivac LS – Deltamune, SA (Neethling Stamm)
- ▶ SPPV RM-65 (JOVAC) (Dosis für Schafe x10)
- ▶ LSDV KSGP O-240 and O-180 strains (mehrere Hersteller) → nicht empfohlen für Milchherden



Mammelitis (BHV-2) = Pseudo Lumpy Skin Disease

- Kürzerer Krankheitsverlauf
- Oberflächlichere Läsionen

Besnoitiose

- In Afrika häufig, kürzlich auch in Zentral- und Westeuropa aufgetreten

Insektenstiche / allergische Reaktionen

Demodikose

- Räude → Milben

Onchocerciose

- Parasitwurm *Onchocerca volvulus*



→ *Labordiagnostik bleibt wichtig!*

Diagnostische Methoden

Immunfluoreszenz Test
SNT / VNT

Immunperoxidase
Monolayer Assay



ELISA



qPCR



ID Screen Capripox Double Antigen multi-species ELISA

Doppel-Antigen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Capripoxviren in Serum und Plasma

Viren:

- Lumpy skin disease virus (LSDV)
- Sheeppox virus (SPPV)
- Goatpox virus (GTPV)

Tierarten*:

- Rinder
- Schafe
- Ziegen



* und andere empfängliche Arten

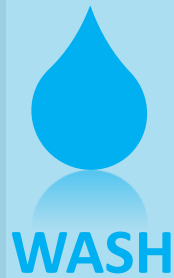
Prinzip des « Double Antigen ELISAs »

Probe



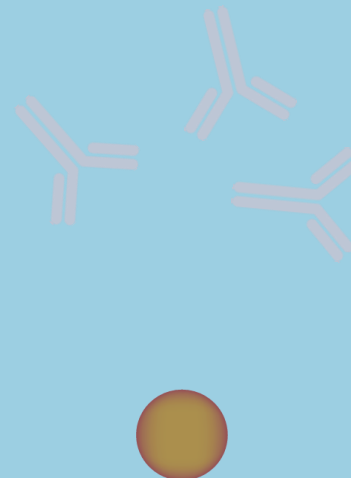
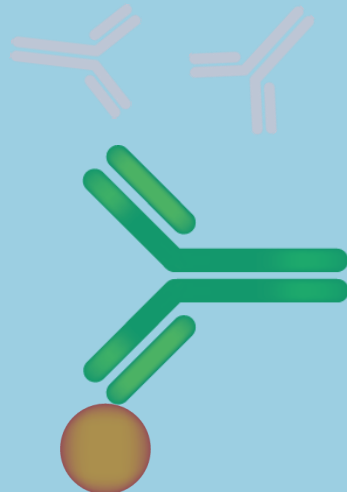
POSITIV

NEGATIV



Antikörper aus dem zu testenden Serum

Antigen

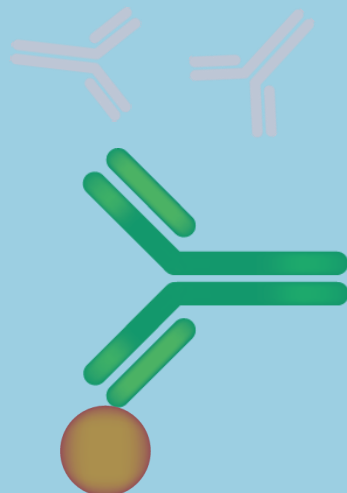


Prinzip des « Double Antigen ELISAs »

Antikörper aus dem zu testenden Serum

Antigen

POSITIV



WASH



NEGATIV



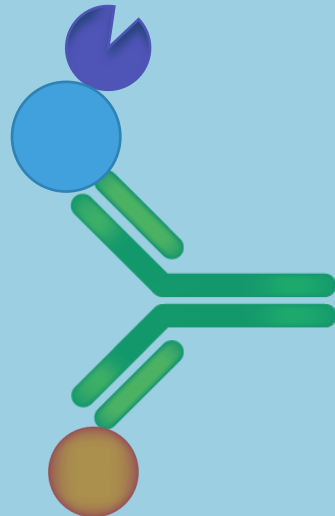
Prinzip des « Double Antigen ELISAs »

Antigen – PO Konjugat

Antikörper aus dem zu testenden Serum

Antigen

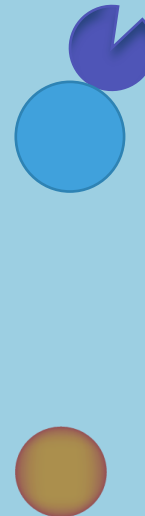
POSITIV



WASH



NEGATIV



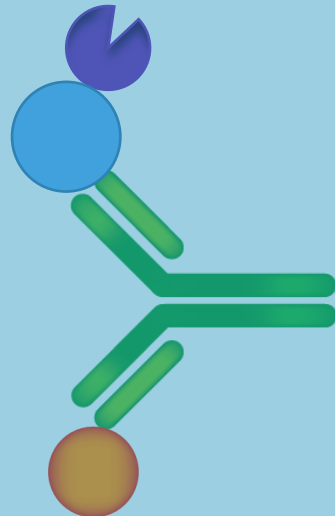
Prinzip des « Double Antigen ELISAs »

Antigen – PO Konjugat

Antikörper aus dem zu testenden Serum

Antigen

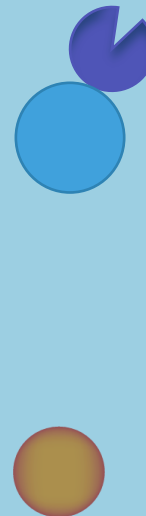
POSITIV



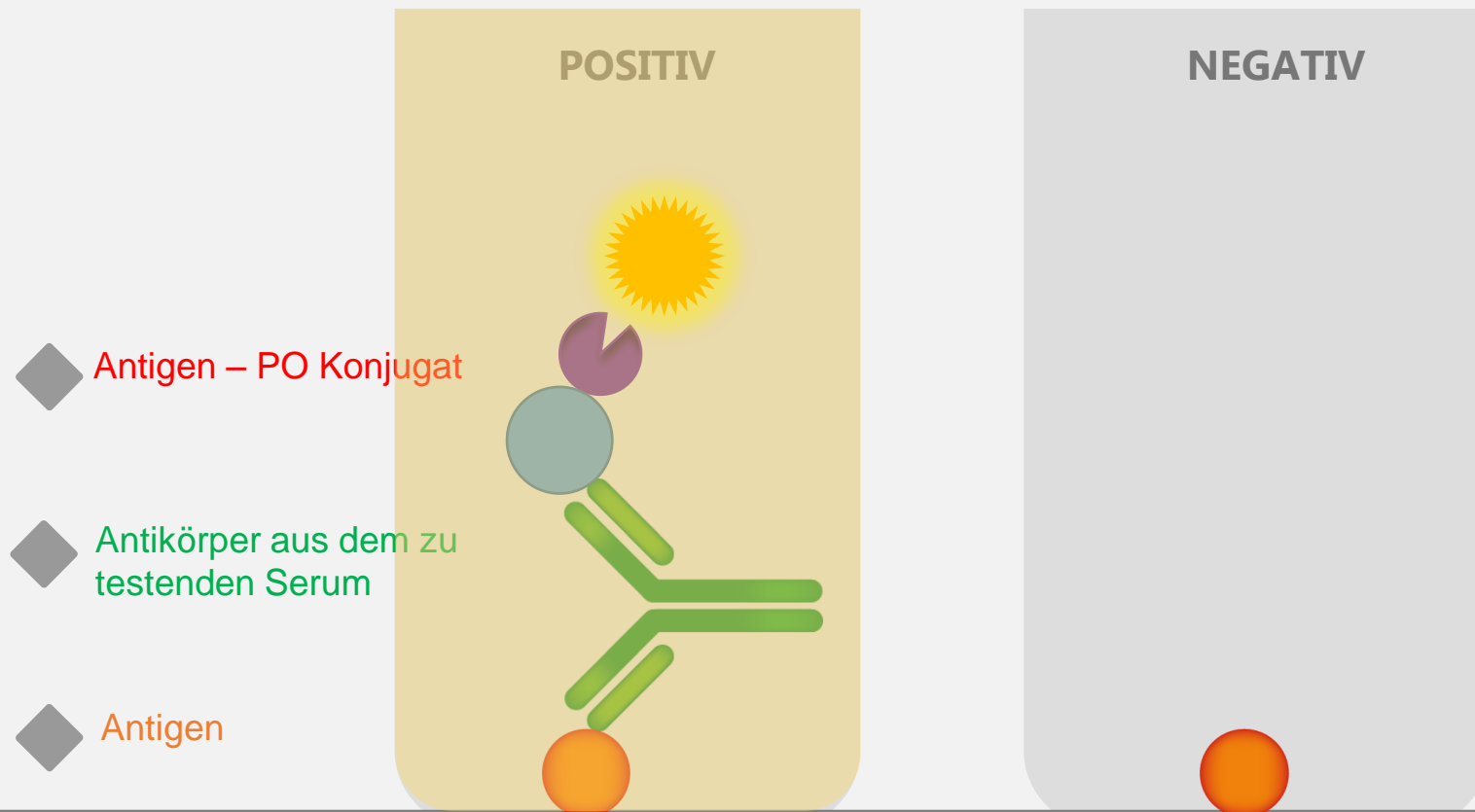
WASH



NEGATIV



Prinzip des « Double Antigen ELISAs »



ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Spezifität

Negative Seren :

IDvet interne Daten : 1381 Seren von nicht infizierten, nicht geimpften Tieren

» 867 Rinder

» 254 Schafe

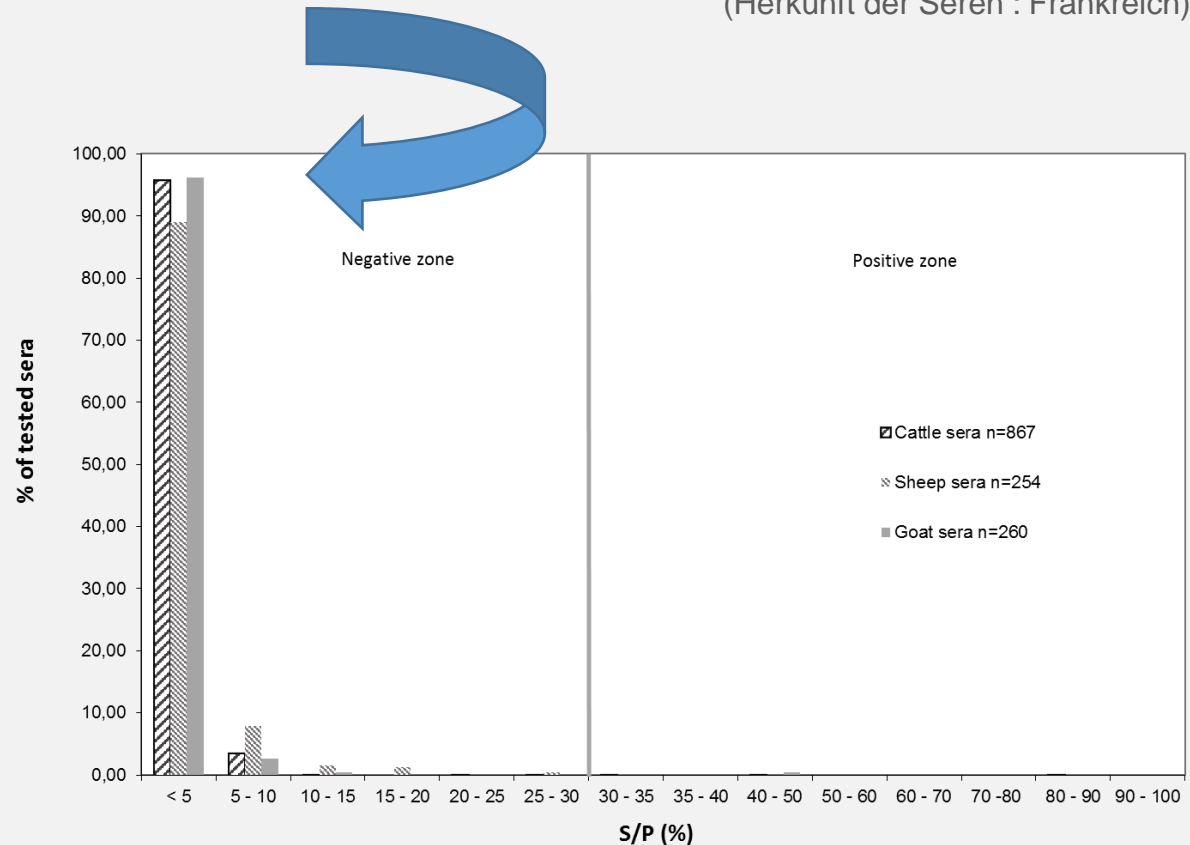
» 260 Ziegen

(Herkunft der Seren : Frankreich)

IDvet + externe Daten* :

Species	Specificity (%) (number of samples)	CI _{95%}
Cattle	99.7 (n=1050)	99.2 – 99.9 %
Goat	99.3 (n=304)	97.6 - 99.8 %
Sheep	100.0 (n=302)	98.8 - 100 %
TOTAL	99.7 (n=1656)	99.3 – 99.9 %

* Friedrich Loeffler Institut + Coda Cerva (Belgien)



Von 1656 getesteten Proben zeigten 1651 negative Ergebnisse.

Beobachtete Spezifität für den ID Screen® ELISA = 99.7% (CI_{95%} : 99.3 – 99.9%)

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Sensitivität
Feldseren

Feldseren von **geimpften** Rindern :

Studien mit verschiedenen Impfstoffen und Probennahmezeitpunkten

Studien von IDvet und Coda Cerva Institut (Europäisches Referenzlabor, Belgien)

- 1 » 11 Feldproben - kommerzieller attenuierter Lebendimpfstoff (LSD Neethling)
» Probennahme 5 Monate p.v.
- 2 » 75 Feldproben - kommerzieller Lebendimpfstoff (LSD Neethling, OBP)
» Probennahme 1 Monat p.v.
- 3 » Je 48 Feldproben - kommerzieller LSD Neethling Lebendimpfstoff (MSD Lumpyvax®)
» Probennahme 2 Monate p.v. und 3 Monate p.v.

Studie am Friedrich-Loeffler-Institut (deutsches Referenzlabor)

- 4 » 31 Feldproben - kommerzieller Lebendimpfstoff LSD Neethling (OBP)
» Probennahme zwischen 6 und 7 Monaten p.v.

Vergleich mit SNT oder IPMA (Immuno Peroxidase Monolayer Assay)

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Sensitivität Studie 1

Studie 1 : IDvet + Coda Cerva

- » 11 Feldproben von geimpften Rindern
- » Kommerzieller attenuierter LSD Neethling Lebendimpfstoff
- » Probennahme 5 Monate p.v.
- » ELISA (IDvet) und IPMA / SNT (Coda Cerva)

	ID Screen® ELISA		IPMA	SNT
	Cut-off : 30%			
Probe	S/P%	Status	Status	Status
1	303	Pos	Neg	Neg
2	303	Pos	Neg	Pos (schwach)
3	12	Neg	Neg	Neg
4	224	Pos	Neg	Neg
5	123	Pos	Neg	Neg
6	291	Pos	Neg	Pos (schwach)
7	95	Pos	Neg	Neg
8	10	Neg	Neg	Neg
9	69	Pos	Neg	Neg
10	270	Pos	Neg	Neg
11	1	Neg	Neg	Neg

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Sensitivität Studie 2

Studie 2 : Coda Cerva Institut (Belgien)

- » 75 Feldproben von geimpften Rindern
- » Kommerzieller LSD Neethling Lebendimpfstoff (OBP)
- » Probennahme 1 Monat p.v.
- » IPMA und ELISA am Coda Cerva

		IPMA*		
		Positiv	Negativ	Total
ID Screen® ELISA	Positiv	31	13	44
	Negativ	9	22	31
Total		40	35	75

* Schwierigkeiten bei der Auswertung von hämolytischen Seren

71% Übereinstimmung zwischen ELISA/ IPMA

17% ELISA + / IPMA –

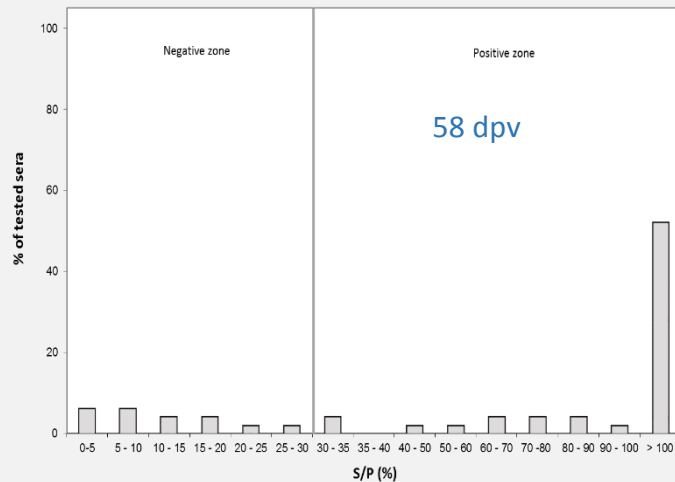
12 % IPMA + / ELISA -

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

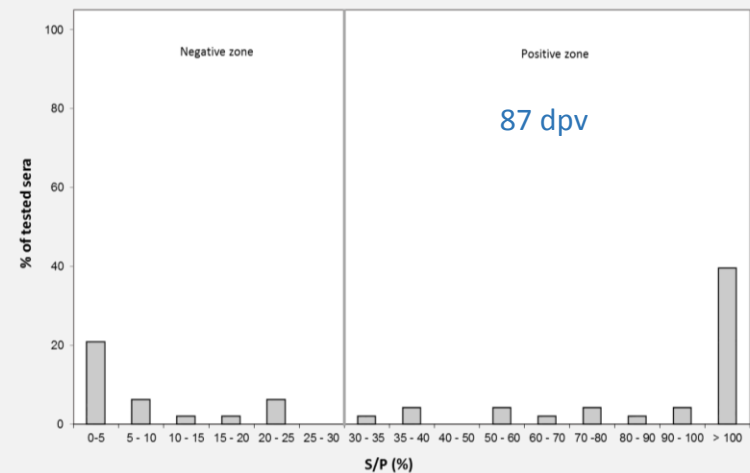
Sensitivität Studie 3

Studie 3 : IDvet / Coda Cerva

- 2 x 48 Feldproben aus zwei Herden
- Kommerzieller attenuierter LSD Neethling Lebendimpfstoff (MSD Lumpyvax®)
- Probennahme 58 dpv (n=48) und 87 dpv (n=48)
- ELISA (IDvet) und IPMA (Coda Cerva)



58 dpv		IPMA		
		Positiv	Negativ	Total
ID Screen® ELISA	Positiv	12	24	36
	Negativ	0	12	12
Total		12	36	48



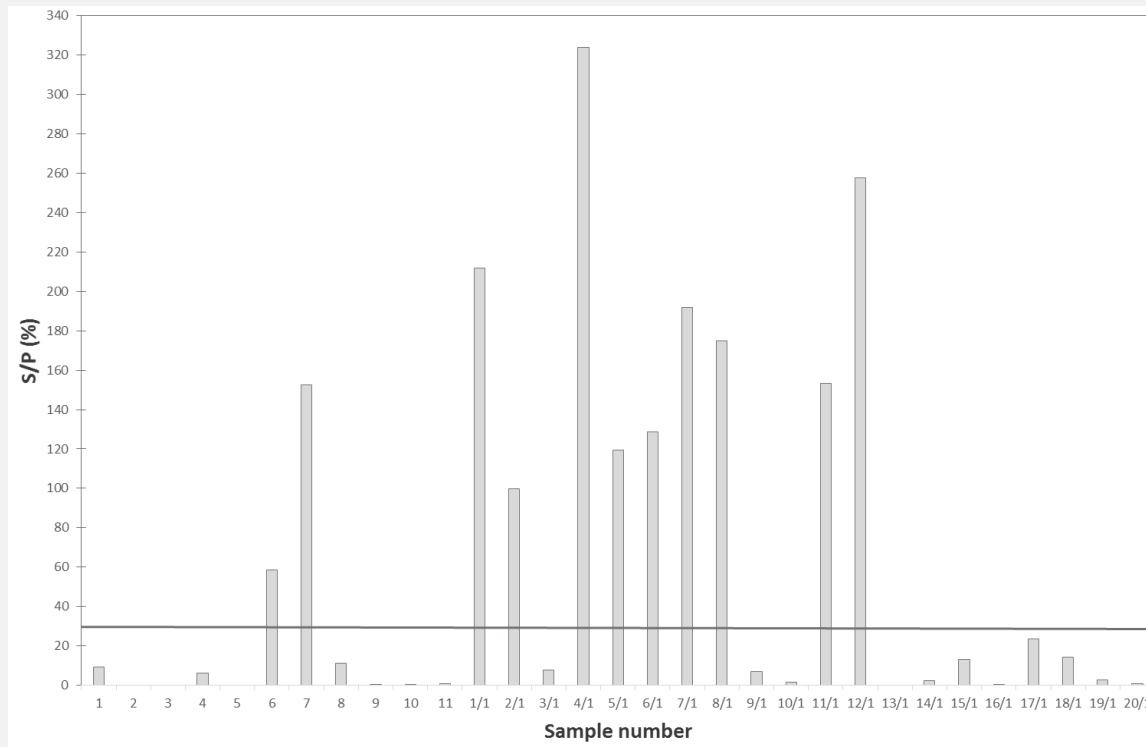
87 dpv		IPMA		
		Positiv	Negativ	Total
ID Screen® ELISA	Positiv	19	8	27
	Negativ	2	14	16
Total		21	22	43

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Sensitivität Studie 4

Studie am Friedrich-Loeffler-Institut

- » 31 Feldproben von geimpften Rindern aus Mazedonien
- » Kommerzieller LSD Neethling Lebendimpfstoff (OBP)
- » Probennahme zwischen 6 und 7 Monaten p.v.



35,5 % der Proben wurden als positiv nachgewiesen

→ Problem bei der Impfstoffapplikation?

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Sensitivität
Tierversuche

Experimentelle Infektionen von Rindern

Studien am Coda Cerva Institut (Belgien), OIE Referenzlabor

- 1
 - » 6 experimentell infizierte Rinder
 - » LSDV
- 2
 - » 6 Rinder aus Impfversuch
 - » LSDV Impfstoff

Vergleich
IPMA / ELISA

Studie am Friedrich-Loeffler-Institut

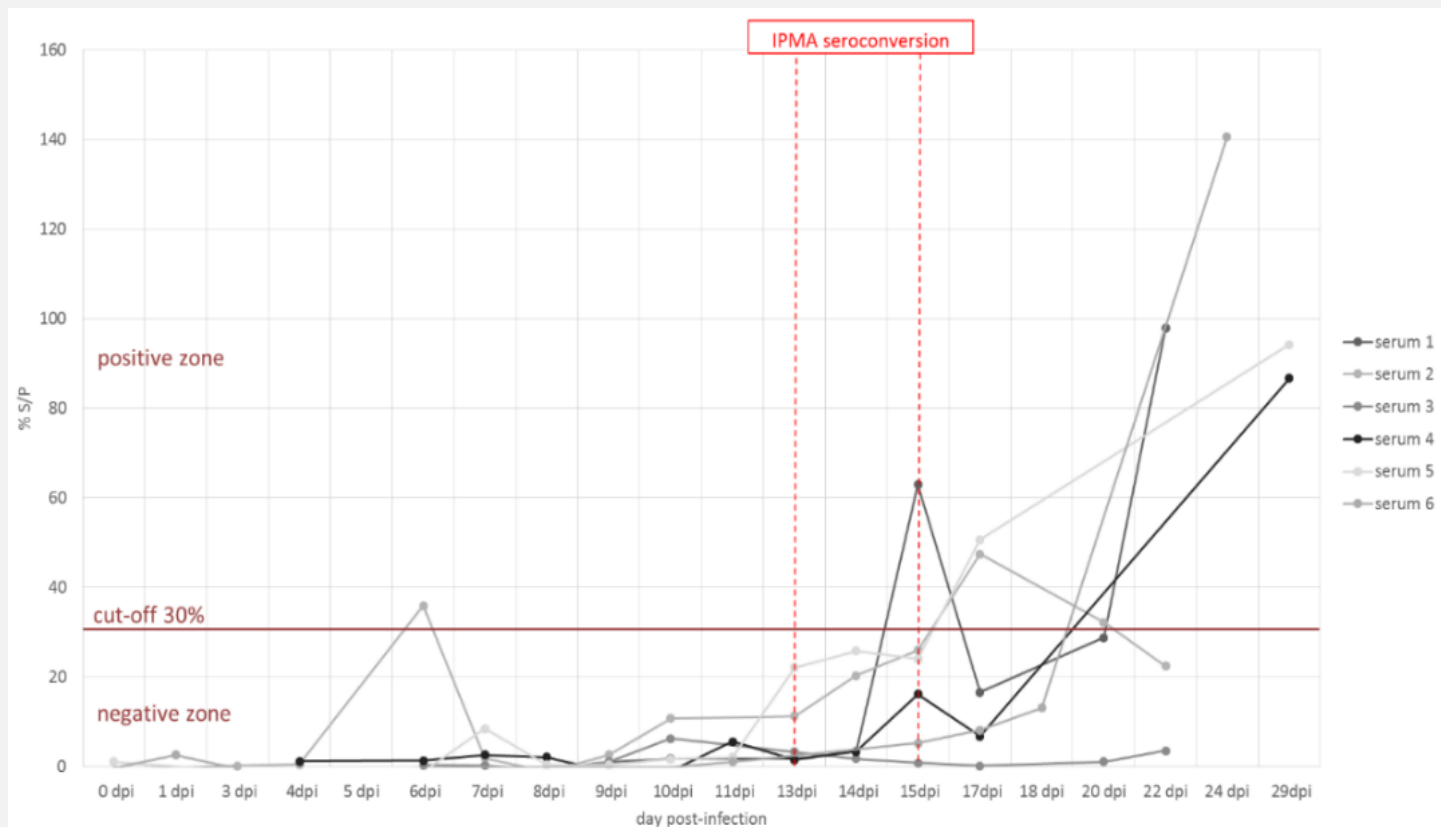
- 3
 - » 6 experimentell infizierte Rinder
 - » LSDV-Macedonia Neethling

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Sensitivität Studie 1

Studie 1: Coda Cerva (Belgien)

- » 6 experimentell infizierte Rinder
- » LSDV



Im ELISA ist die Serokonversion zwischen **22 und 29 dpi** nachweisbar

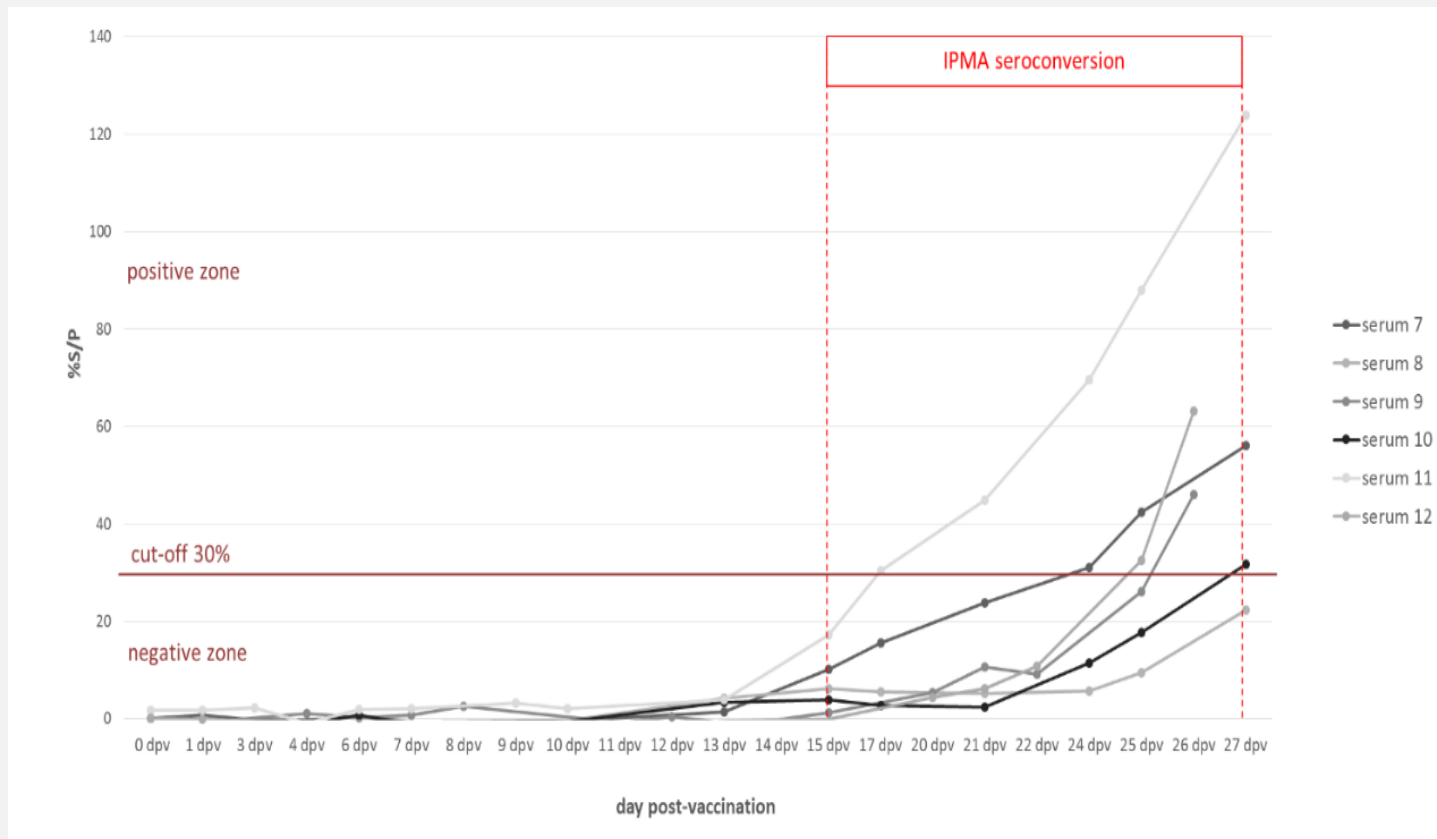
IPMA : 13 -15 dpi

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Sensitivität Studie 2

Studie 2: Coda Cerva (Belgien)

» 6 Rinder aus Impfversuch (LSDV)



Im ELISA ist die Serokonversion zwischen 17 und 29 dpi nachweisbar.

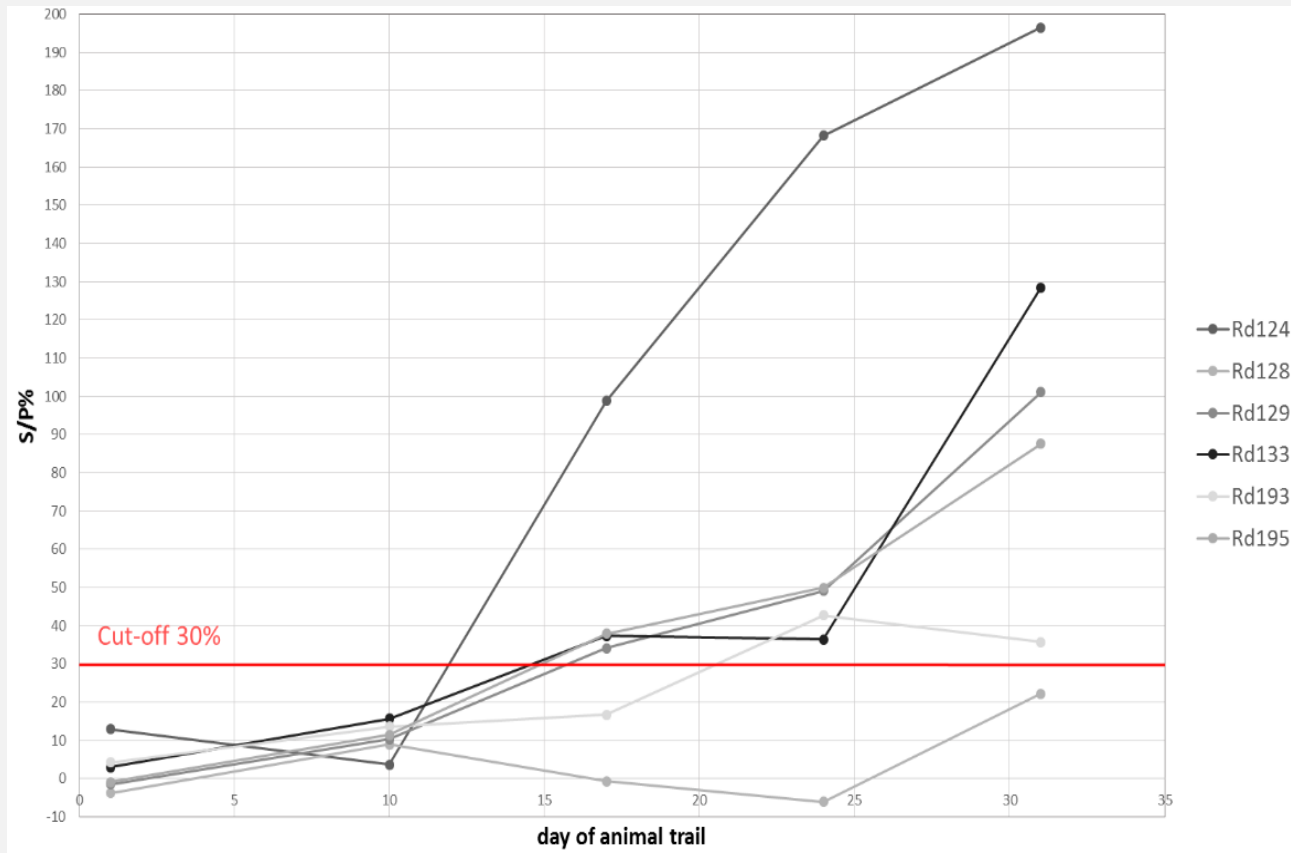
IPMA : 15 - 27 dpi

ID Screen CPV Double Antigen ELISA

Sensitivität
Studie 3

Studie 3: Friedrich Loeffler Institut

6 experimentell infizierte Rinder (LSDV Neethling Macedonia2016)



Im ELISA ist die Serokonversion zwischen 12 und 21 dpi nachweisbar (für 5/6 Tieren).
Weitere Studien laufen am FLI (+ Vergleich SNT / IF)

Zusammenfassung ELISA

- Der **ID Screen® Capripox Double Antigen multi-species** ELISA zeigt eine sehr gute Spezifität und eine gute Sensitivität
- Bei experimentellen Infektionen konnte eine Serokonversion nach 12-29 Tagen nachgewiesen werden
- Bei Impfungsversuchen konnte eine Serokonversion nach 17-29 Tagen nachgewiesen werden
- Kurzes Protoll (< 3 Std.) und einfach in der Anwendung

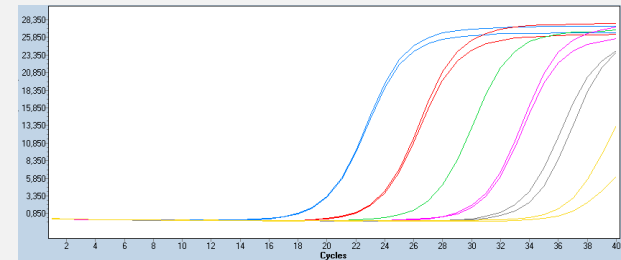


ID Gene™ Capripox Virus Triplex (Pan Capripox)

- FAM = Nachweis von Capripox Viren (bovine, ovine and caprine Feldstämme und Impfstämme)
- VIC = endogene interne Kontrolle (Validierung des Vorhandenseins von Zellen in der Probe)
- Cy5 = exogene interne Kontrolle (Virus, muss zu jeder Probe vor der Extraktion hinzugegeben werden) → Extraktions- und Amplifikationskontrolle

ID Gene™ LSD DIVA Triplex (Feld- / Impfstamm)

- FAM = Nachweis von LSDV Feldstämmen
- VIC = Nachweis von LSDV Neethling Impfstämmen
- Cy5 = exogene interne Kontrolle (Virus, muss zu jeder Probe vor der Extraktion hinzugegeben werden) → Extraktions- und Amplifikationskontrolle



Beide Methoden werden aktuell am Friedrich-Loeffler-Institut und am CODA-CERVA Institut validiert.

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

