

# Nutzung von Tränketupfern in der Geflügelpestdiagnostik

## Ein Erfahrungsbericht aus Mecklenburg-Vorpommern

Carola Wolf, Matthias Seelmann

**In Mecklenburg-Vorpommern wurden bei der Routinediagnostik auf Aviäre Influenza in Geflügelbeständen Tränketupfer entnommen und die Ergebnisse mit denen der parallel entnommenen kombinierten Rachen-/Kloakentupfer verglichen. Die Erfahrungen sind hier kurz zusammengefasst.**

Bei Verdacht auf anzeigepflichtige Tierseuchen, meldepflichtige Tierkrankheiten oder nach Animal Health Law (AHL, Verordnung EU 2016/429) gelistete Seuchen bzw. Zoonosen werden im Regelfall Proben direkt von lebenden oder toten Tieren untersucht. Bei Fragestellungen wie Monitoring, Überwachung der Unverdächtigkeit, Freitestung von Kontaktbeständen etc. ist die Untersuchung von Umgebungsproben (z. B. Staub, Gülle, Sockentupfer, Kaustricke) oder Sammel- bzw. Poolproben (z. B. Sammelkot, Tank-/Poolmilch, Poolserum, Hodensaft) teilweise gesetzlich verankert (wie bei der Umsetzung der „*Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern*“ mit nachfolgenden Änderungsverordnungen). Weitere mögliche Untersuchungsanlässe wären die Verbringung zur Ausstellung bzw. zur Schlachtung. Es werden aber auch Proben, die im Zusammenhang mit biotechnologischen Maßnahmen entstehen, auf diverse, z. T. auch außerhalb der Anzeige- bzw. Meldepflicht liegende Tierkrankheiten untersucht (z. B. Ohrstanzen nach der „*Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV-Verordnung)*“ vom 11.12.2008, Fleischsaft nach Schweine-Salmonellose-Verordnung vom 13.03.2007). Es handelt sich

um material- und zeitsparende, für den Bestand aussagekräftige und nicht zuletzt kostengünstige Verfahren aus vergleichsweise leicht und tierschonend zu gewinnenden Proben.

### Grundsätzliche Überlegungen zum Einsatz von Tränketupfern

Zur Untersuchung auf Aviäre Influenza (AI)-Viren ist in Geflügelbeständen die Gewinnung kombinierter Rachen-/Kloakentupfer von individuellen, lebenden Tieren zeitaufwändig und mit hohen Belastungen für alle Beteiligten verbunden. Darüber hinaus wird im Labor ein erheblicher Ressourcenverbrauch generiert. Im Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V) wurden 2023 rund 3 000 solcher Proben (ein Drittel einzeln, zwei Drittel im Pool) auf AI-Viren untersucht. Im Zusammenhang mit epidemiologischen Fragestellungen wurden bei Geflügelpestausschüben auch Futter- und diverse Staub-/Umgebungsproben (Tupfer vom Eierband, Lüfter etc.) auf AI-Viren getestet, teils mit plausibel positivem Ergebnis.

Die bisher wenig etablierte Gewinnung und Untersuchung von Tränketupfern in Putenhaltungen ist eine tierschonende Methode zur Erlangung von aussagekräftigen Bestandsproben [1]. Jedes Tier mit einer Atemwegsinfektion hinterlässt bei der Wasseraufnahme geringe Mengen seines infektiösen Atemwegssekrets in/an der Tränke. Nach Sieverding [1] ist bereits vor dem Auftreten erster klinischer Auffälligkeiten AI-Virusmaterial in den Tränken enthalten. Mit der Beprobung von gleichmäßig

im Stall verteilten Tränken erhält man annähernd von jedem infizierten Tier geringste Mengen Atemwegssekret [1]. Im Vergleich zu Sammelkotproben oder auch Kloakentupfern befinden sich in Tränketupfern nur wenig Verunreinigungen bzw. potenzielle PCR<sup>1</sup>-Inhibitoren, sodass sehr sensitive AI-PCR-Nachweise möglich sein sollten.

## Material und Methodik

Insgesamt wurden im LALLF M-V bisher Tränketupfer aus 18 Stalleinheiten untersucht. Die ersten Tränketupfer wurden Ende des Jahres 2023 bei Verdacht auf Geflügelpest in einem Wassergeflügelbestand zusätzlich zu den amtlichen Rachen-/Kloakentupfern eingesandt. 2024 wurden sowohl bei der Überwachung unverdächtiger Kontaktbestände als auch bei klinischem Geflügelpestverdacht in Legehennen- und Putenbeständen Tränketupfer zusätzlich zu den gesetzlich vorgeschriebenen Rachen-/Kloakentupfern untersucht. Im Fall von klinischem AI-Verdacht und bei paralleler Einsendung verendeter Tiere zur Sektion (hier nicht dargestellt) wurden in drei Fällen weniger als 20 Kombitupfer eingesandt.

Die Entnahme von Tränketupfern erfolgte mit dem Sigma Virocult<sup>®</sup>-System und ist exemplarisch in **Abbildung 1 und 2** dargestellt. Details zur Entnahme von Tränketupfern sind in der Arbeit von Sieverding [1] dargelegt.

Die Nukleinsäureextraktion erfolgte mit dem NucleoMag<sup>®</sup> VET-Kit (Fa. Macherey-Nagel), die generische AIV-PCR<sup>2</sup> mit dem virotype<sup>®</sup>

<sup>1</sup> Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

<sup>2</sup> PCR zum Nachweis von Influenzavirus A, unabhängig vom Subtyp



Abb. 1: Entnahme von Tränketupfern an Rundtränken



Abb. 2: Entnahme von Tränketupfern an Strangtränken

Influenza A 2.0 RT-PCR-Kit sowie eine Subtypisierungs-PCR<sup>3</sup> mit dem virotype<sup>®</sup> Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR-Kit (beide Kits Fa. Indical). Parallel zu den insgesamt 125 Tränketupfern wurden die kombinierten Rachen-/Kloakentupfer repräsentativer Stichproben (insgesamt 397) aus den jeweiligen Beständen untersucht.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung sind in der **Tabelle 1** aufgelistet. Beginnend im Dezember 2023 wurden im LALLF M-V erstmals Tränketupfer parallel zu kombinierten Rachen-/Kloakentupfern bei Ausbruch der Geflügelpest in einem Wassergeflügelbestand untersucht. In den insgesamt 18 Einsendungen wurde in 17 Fällen eine Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Tränketupfern und kombinierten Rachen-/Kloakentupfern festgestellt. Nur einmal lag durch die fehlende Auswertbarkeit der Tränketupfer eine Abweichung vor.

<sup>3</sup> hier PCR zur Bestimmung der Hämagglutinin-Subtypen von Influenza A-Viren

Bestände	Tierart	Vorbericht	Ergebnis (IVA*)	Bewertung
10	9 x Huhn 1 x Pute	Kontaktbestand zu HPAI H5N1-Ausbruchsbestand ohne Klinik	KT und TT negativ	Übereinstimmung
3	Huhn	Kontaktbestand zu HPAI H5N1-Ausbruchsbestand ohne Klinik	KT negativ, TT teils n. a. (AI-PCR)	2 x Übereinstimmung, 1 x keine Bewertung mgl.
1	Pute	Verendungen, Sektion: kein AI-Verdacht	KT und TT negativ	Übereinstimmung, Verendung technol. bedingt
1	Ente Gans	Enten mit Klinik	KT und TT positiv	Übereinstimmung
		Gänse ohne Klinik, ohne Sentinel Enten ohne Klinik, mit Sentinel (gesund)	KT und TT positiv KT und TT negativ	
1	Huhn	Stall 1 ohne Klinik Stall 2 mit Klinik und H5N1 aus Verendungen	KT und TT positiv KT und TT positiv	Übereinstimmung (TT bereits im Stall ohne Klinik positiv!)
1	Huhn Ente	Hühner mit H5N1 Enten ohne Klinik (räumlich getrennt)	KT und TT positiv KT und TT negativ	Übereinstimmung
1	Huhn	Stall 1 ohne Klinik	KT und TT negativ	Übereinstimmung, aber 1 TT „falsch“ negativ**
		Stall 2 mit Klinik und H5N1 aus Verendungen	KT positiv, TT 2 positiv, 1 negativ	

\* IVA: Influenzavirus A aus AI- bzw. H5/H7/H9-PCR

\*\* Nippeltränke ohne Auffangschale

Tab. 1: Untersuchung von Tränketupfern (TT) parallel zu kombinierten Rachen-/Kloakentupfern (KT) im Rahmen der Geflügelpestdiagnostik in M-V 2023/2024

Auch der AI-Ausbruch bei Wassergeflügel, das selbst bei Infektionen mit hochpathogenen AI-Viren klinisch unauffällig bleiben kann, sofern keine Sentinelhühner im Bestand sind, wurde richtig erkannt. Im vorliegenden Fall waren Tränketupfer bereits in einer Herde ohne Sentineltiere AI-positiv, in der noch keine klinischen Symptome, geschweige denn Verluste auftraten. Im zugehörigen klinisch unauffälligen Puten-Kontaktbestand waren sowohl die Tränketupfer als auch die kombinierten Rachen-/Kloakentupfer in der AI-PCR negativ.

Auf die Angabe der ct-Werte<sup>4</sup> aus Kombi- und Tränketupfern wurde in **Tabelle 1** aus Gründen der Datenmenge bzw. Übersichtlichkeit verzichtet. Die Werte der Tränketupfer lagen im Mittel 3 bis 9  $\Delta$ ct<sup>5</sup> höher als die Werte der Kombitupfer. Exemplarisch seien zur Größenordnung der Tränketupfer die ct-Werte des Falls in **Tabelle 1** Zeile 5 genannt: Im klinisch unauffälligen Stall 1 lagen die ct-Werte der Tränketupfer zwischen 26 und 34 (Mittelwert 30,7), im klinisch auffälligen Stall 2 zwischen 25 und 27 (Mittelwert 25,8), während die ct-Werte der Kombitupfer verendeter Tiere aus Stall 2 zwischen 17 und 23 betragen.

Wenngleich die Probenmatrix „Tränketupfer“ außerhalb der Zulassung des Testkitherstellers liegt, ließen sich bei ausreichend vorhandenem Biofilm valide PCR-Ergebnisse erzielen. Im AI-positiven Fall waren aus den Tränketupfern schon in der AI-PCR ausnahmslos gut auswertbare Signale der sogenannten „endogenen internen Kontrolle“ ( $\beta$ -Actin, Housekeeping-Gen aus tierischen Zellen zur Bestätigung der korrekten Entnahme, Extraktion und Amplifikation) zu verzeichnen. Diese Kontrolle zeigt an, dass bei der Probenahme tierische Zellen aufgenommen wurden und schließt u. a. falsch negative Ergebnisse durch fehlenden Tierkontakt i. w. S. aus. Im AI-negativen Fall (z. B. bei Untersuchung von Kontaktbeständen) fielen diese internen Kontrollen in Tränketupfern jedoch aufgrund des Vorhandenseins von nur wenig zellulärem Material überwiegend schwach aus bzw. fehlten, was zu teils nicht auswertbaren (n. a.) Ergebnissen führte. Insbesondere wenn aufgrund der Tränkekonstruktion wenig Biofilmfäche bestand (Strangtränken, v. a. Nippeltränken ohne Auffangschale), trat dieses Problem auf. Bei Verwendung des H5/H7/H9-Typisierungskits mit einer synthetischen, sogenannten „exogenen internen Kontrolle“, die lediglich den Erfolg der Amplifikation abbildet, waren hingegen in allen Tränketupfern akzeptable Signale der internen Kontrolle zu verzeichnen und die Ergebnisse zumindest technisch auswertbar. Diese synthetische Kontrolle wird der PCR hinzugefügt und schließt lediglich falsch negative Ergebnisse durch Inhibition der PCR aus.

Um bei Nippeltränken ohne Auffangschale genügend zelluläres Material zu erhalten, wäre es ratsam, den Nippel mit dem Tupfer abzuwischen und zusätzlich den Tupfer mit dem feuchten Material vom Boden unterhalb der Nippeltränke zu benetzen. Aus Gründen der Ressourcenschonung und Effektivierung des Verfahrens wurden seit Februar 2024 die Tränketupfer nur noch mit der H5/H7/H9-Typisierungs-PCR untersucht. Diese Vorgehensweise vermindert einerseits nicht auswertbare Ergebnisse, birgt allerdings theoretisch die Gefahr falsch negativer Ergebnisse bei fehlender Erfassung von Geflügelzellen bei der Probenahme. Nach eigenen Erfahrungen wird im Fall von Geflügelpest im Bestand jedoch von erkrankten Tieren so viel zelluläres Material freigesetzt, dass selbst 5 Wochen nach der Bestandsräumung und erfolgter erster

<sup>4</sup> cycle threshold (Schwellenwertzyklus): Die Zahl der Zyklen in einer PCR, die nötig sind, um einen vorher definierten Grenzwert der amplifizierten DNA zu überschreiten und um ein positives Signal zu erhalten. Je mehr Nukleinsäure in einer Probenlösung vorliegt, desto kleiner ist die Zahl der Amplifikationszyklen bzw. der ct-Wert.

<sup>5</sup> Differenz der ct-Werte zwischen unterschiedlichen Ansätzen/Messungen: ein höherer  $\Delta$ ct von 3 entsteht durch ca. 10-fach weniger Nukleinsäure, ein höherer  $\Delta$ ct von 9 durch knapp 1000-fach weniger Nukleinsäure, d. h. in den Tränketupfern war i. d. R. deutlich weniger AI-RNA als in den Kombitupfern

Reinigung/Desinfektion Umgebungstupfer von z. B. Anflugstangen, Eier- und Kotbändern u. U. noch sicher positive AI-PCR-Ergebnisse generieren (aktuelle, unveröffentlichte Daten). Um falsch negative Ergebnisse mit Sicherheit zu vermeiden, muss man aber die generische AI-PCR mit endogener interner Kontrolle verwenden, wohl wissend, dass im AI-negativen Fall (in Ermangelung von Geflügelzellen in Tränketupfern) auch mit „nicht auswertbar“-Resultaten zu rechnen ist.

Ein Disclaimer bezüglich der Probenmatrix zum Einsatz des Testkits außerhalb der Zulassung wäre im Befund aktuell ohnehin notwendig und könnte mit einer Erklärung für nicht auswertbare Ergebnisse ergänzt werden. Es ist geplant, diese Verfahrensweise – generische AI-PCR mit ggf. nicht auswertbaren Ergebnissen – künftig im LALLF M-V einzusetzen.

In der Zusammenschau der Ergebnisse bestätigt sich, dass Tränketupfer in der Summe in jedem Fall den AI-Ausbruch anzeigen, teils sogar bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome (s. Tab. 1, Zeile 5). Dabei sind jedoch mehrere, repräsentativ verteilte Tränketupfer pro Stall notwendig; eine Poolung von bis zu 10 Tupfern ist sinnvoll (Details bei [1]). Die anscheinend bestehende „Schwachstelle“ der Nippeltränke ohne Auffangschale ohne nennenswerten Biofilm (s. Tab. 1, Zeilen 2 und 7) muss dabei insbesondere durch eine ausreichende Zahl beprobter Tränken berücksichtigt werden.

Die Abschlussuntersuchungen in unauffälligen Kontaktbeständen zeigten – abgesehen von einem Fall nicht auswertbarer Tränke-

tupfer – übereinstimmend negative Ergebnisse aus Kombi- und Tränketupfern, was auch unter Praxisbedingungen für eine hohe Spezifität des Verfahrens spricht.

### Fazit

Die in der AI-Routinediagnostik in Geflügelbeständen bisher wenig gebräuchlichen Tränketupfer haben nach unseren bisherigen Erfahrungen bei korrekter Entnahme im Biofilm am Übergang von der Wasseroberfläche zur Tränke wand an repräsentativen Stellen im Bestand ein hohes diagnostisches Potenzial, da sie AI-Virus im Bestand sehr zeitig und sensitiv anzeigten. Zudem könnten Tränketupfer Verwendung in einer ökonomisch vertretbaren Freitestung von Geflügelbeständen vor Ausstellungen bzw. zur Schlachtung finden. Allerdings sind sie bisher noch nicht in die amtliche Methodensammlung aufgenommen worden. Praktische Erfahrungen ersetzen zwar keine geplanten Studien, könnten diese jedoch trefflich ergänzen und vielleicht – kombiniert mit Proben von Indikator-tieren – in spe zur „amtlichen Etablierung“ von Tränketupfern beitragen.

### Danksagung

Unser Dank gilt den beteiligten Amtstierärzten aus den Kreisen Nordwestmecklenburg, Vorpommern-Rügen und Mecklenburgische Seenplatte für ihre engagierte Tränketupfer-Probenahme zusätzlich zu den erforderlichen zahlreichen Rachen-/Kloakentupfern im Zusammenhang mit Geflügelpestausrüchen und der Überwachung von Kontaktbetrieben.

Prof. Dr. Timm Harder, Leiter des WOAH-, FAO- und Nationalen Referenzlabors (NRL) für Aviäre Influenza/Geflügelpest danken wir für die Inspiration und Beratung zur Veröffentlichung dieses Erfahrungsberichts. Nicht zuletzt gilt unser Dank Dr. Erwin Sieverding für die freundliche Überlassung der Fotos zur Entnahme von Tränketupfern.

### Literatur

- [1] Sieverding E (2023): Tierschonende Probengewinnung bei Aviärer Influenza: eine empirische Studie. Der Praktische Tierarzt 12. [www.vetline.de/tierschonende-probengewinnung-bei-aviaerer-influenza-eine-empirische-studie](http://www.vetline.de/tierschonende-probengewinnung-bei-aviaerer-influenza-eine-empirische-studie).

### Korrespondenz

#### Dr. Carola Wolf



Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei M-V, Abteilung Tierseuchendiagnostik/PCR-Labor, Thierfelderstr. 18, 18059 Rostock, [carola.wolf@lallf.mvnet.de](mailto:carola.wolf@lallf.mvnet.de)