

## Untersuchungen an Fledermaustodfunden zum Vorkommen der Fledermaustollwut in Deutschland

Von CONRAD M. FREULING, JULIANE SCHATZ, Wusterhausen, BÄRBEL POTT-DÖRFER, Hannover, DIETRICH HEIDECKE, Halle (Saale), GUDRUN WIBBELT, KRISTIN MÜHLDOERFER, Berlin, JEANETTE KLIEMT und THOMAS MÜLLER, Wusterhausen

Mit 1 Abbildung

### Abstract

#### Investigations of deceased bats for bat rabies surveillance in Germany

Systematic bat rabies surveillance is restricted due to the protected status of European bats. Here we present a study on passive surveillance with more than 3,000 tested bats from most of the German federal states. While 8 % of the samples could not be investigated, the percentage of positive animals was 1.2 %. Both EBLV-1 and -2 were detected among the samples. Despite the high number of investigated bats, unfortunately, the samples were not homogeneously distributed. Future attempts should direct to establish structures in all federal states that allow archiving and testing of dead found bats and thus fulfilling the requirements as stipulated in the EUROBATS agreement.

### Zusammenfassung

Systematische Untersuchungen zur Fledermaustollwut in Deutschland sind vor dem Hintergrund des Artenschutzes nur bedingt möglich. Im Rahmen dieser Studie sind über 3.000 Fledermaustodfunde aus fast allen deutschen Bundesländern untersucht worden. Während 8 % der Proben nicht auswertbar waren, lag der Anteil der Positiven bei 1,2 %. Sowohl EBLV-1 als auch EBLV-2 konnten nachgewiesen werden. Trotz der hohen Untersuchungszahlen ist diese Stichprobe leider nicht homogen, zeitlich wie räumlich, verteilt. In Zukunft sollten in allen Bundesländern Strukturen geschaffen werden, die die Archivierung und Auswertung von Fledermaustodfunden ermöglichen und somit den Forderungen des EUROBATS Abkommens Rechnung tragen.

### Keywords

Bat rabies, lyssavirus, *Chiroptera*

### 1 Einleitung

Tollwut ist eine anzeigepflichtige Tierseuche, die auch für den Menschen gefährlich werden kann. Dies trifft so auch auf die Fle-

dermaustollwut zu. Während die Fuchsvermittelte klassische Tollwut in Deutschland getilgt wurde, werden wir aber auch in Zukunft mit der Fledermaustollwut leben müssen, und so ist es wichtig, mehr über die Häufigkeit bei Fledermäusen zu erfahren. Leider gibt es über das wahre Vorkommen und die Verbreitung von Fledermaustollwut in Deutschland und Europa nur unzureichende Erkenntnisse (MÜLLER & FREULING 2006). Eine Ursache liegt darin, dass fast alle europäischen Fledermausarten vom Aussterben bedroht sind und deshalb nach den Vorschriften der Richtlinie 92/43/EWG des Rates der EU, durch das Abkommen zur Erhaltung der Fledermäuse in Europa (EUROBATS, Anon. 1991), oder durch nationale Rechtsvorschriften streng geschützt sind. Aus diesem Grund ist es verständlicherweise unmöglich, ein Tollwut-Überwachungssystem bei Fledermäusen ähnlich dem bei Füchsen zu etablieren. Im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes und der Tierseuchenbekämpfung bzw. Überwachung werden daher in den Landesveterinäruntersuchungsämtern überwiegend solche Tiere untersucht, bei denen bereits ein Verdacht vorlag bzw. dieser ausgeschlossen werden muss. Zwangsläufig ist diese Stichprobe nicht repräsentativ für die Fledermauspopulationen.

Bisher sind vier Fledermaus-assoziierte Lyssaviruspezies in Europa nachgewiesen worden: Europäische Fledermaustollwutviren (EBLV) Typ 2, und das Westkaukasische Fledermaustollwutvirus (WCBV) und jüngst bei einer Fransenfledermaus das Bokeloh-Fleder-

maustollwutvirus (s. FREULING et al., diese Ausgabe). Während EBLV-1 eine spezifische Assoziation mit der Breitflügelfledermaus (*Eptesicus serotinus*) hat, ist EBLV-2 bisher nur sporadisch bei Fledermäusen der Gattung *Myotis* (*M. daubentonii* und *M. dasycneme*) nachgewiesen worden (FREULING et al. 2008, MÜLLER et al. 2007). Im Folgenden werden hier Ergebnisse der überwiegend am nationalen Referenzlabor (NRL) für Tollwut durchgeführten Untersuchungen vorgestellt.

## 2 Material und Methode

Auf Initiative des NRL für Tollwut wurde im Jahr 1997 mit Museen, wissenschaftlichen Instituten, Koordinierungsstellen für den Fledermausschutz und anderen Institutionen Kontakt aufgenommen, um die Verfügbarkeit von Fledermaustodfunden für die Tollwutuntersuchungen zu eruieren. Die Fledermausbeauftragten der Länder sind darüber hinaus bei verschiedenen Veranstaltungen über das Problem der Fledermaustollwut informiert und zur Mitarbeit eingeladen worden. Zusätzlich sind Fledermäuse, welche im Rahmen eines Projektes an das Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW, Berlin) übersandt wurden, parallel auch der Tollwutuntersuchung zugeführt worden.

### 2a Gehirnmaterialentnahme

Die Entnahme von Gehirnmateriale erfolgte in Abhängigkeit von der weiteren Verwendung der Fledermäuse. Beispielsweise besteht bei Museen oder anderen Einrichtungen für den Fledermausschutz die Notwendigkeit, die Fledermäuse im intakten Zustand zurück zu bekommen. In diesem Fall erfolgte die Entnahme mittels einer Nadel-Aspiration. Hierbei wurde die Schädelplatte im Bereich des Hinterhauptes mit Hilfe einer Kanüle durchstoßen und Gehirnmateriale aspiriert.

Stand die ganze Fledermaus zur Verfügung, wurden zunächst mit einem Skalpell Haut und Muskulatur im Hinterhauptbereich durchtrennt. Anschließend wurde das Schädeldach halbkreisförmig am Foramen magnum (Hin-

terhauptloch) beginnend eröffnet und das Schädeldach seitlich weggeklappt, um Gehirnmateriale zu entnehmen.

### 2b Tollwutnachweis

Der Nachweis einer Tollwutvirusinfektion im Fledermausgehirn erfolgte über einen direkten Immunfluoreszenztest (IFT, DEAN et al. 1996). Dazu wurden Tupfpräparate hergestellt, luftgetrocknet und fixiert. Anschließend wurden die Proben mit Fluorescein-Farbstoff markierten Anti-Tollwut-Antikörpern angefärbt. Die Auswertung erfolgte unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop.

Zur Bestätigung und zur weiteren Charakterisierung wurde das Virus zudem in Zellkultur isoliert (WEBSTER & CASEY 1996). Mausneuroblastomzellen (NA 42/13) und die Gehirnsuspension wurden gemischt und in eine Gewebekulturflasche gegeben. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 3-5 % erfolgte der Nachweis erneut mit dem IFT.

Zum Nachweis von viraler RNA und zur Differenzierung zwischen EBLV-1 und -2 wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Nach der Aufreinigung der RNA mittels eines kommerziellen Kits (RNEasy, Qiagen) erfolgte der Nachweis durch Amplifikation und Visualisierung eines 373 respektive 418 Basenpaar (bp) umfassenden Fragments des N-Gens (Vos et al. 2004a, Vos et al. 2004b).

### 2c Datenaufbereitung

Von den Fledermaustodfunden lagen größtenteils Angaben zum Fundort und Funddatum sowie zur Spezies und dem Geschlecht vor. Diese Informationen und die Laborergebnisse wurden in einer Datenbank zusammengefasst. Mit Hilfe von geographischen Informationssystemen (GIS) ist es möglich, die Verteilung der getesteten Fledermäuse räumlich darzustellen und auszuwerten.

Tabelle 1. Einsendungen an Fledermäusen pro Bundesland in den Jahren 1998-2010.

Eingangs- jahr	Bundesländer													?	total		
	BE	BB	BW	BY	HB	HE	MV	NI	RP	SH	SN	ST	TH				
1998		1						93									94
1999		217										1					218
2000	21			103	1	39	31	150			19	45	3				412
2001							29				9						38
2002		2						15		41			36				94
2003	24	5	99			1		2		216			31				378
2004		6	20						77	34			94				231
2005	21	25	133				7										186
2006		13	20														33
2007		4	91				1	14		17	80	123	23				353
2008	34	42	166		35	1		186		3	3	67	3	1			541
2009	36		27	98				34				32		39			266
2010	87	14		10										66			177
<b>total</b>	<b>223</b>	<b>329</b>	<b>556</b>	<b>246</b>	<b>1</b>	<b>41</b>	<b>68</b>	<b>494</b>	<b>77</b>	<b>311</b>	<b>111</b>	<b>268</b>	<b>190</b>	<b>106</b>			<b>3021</b>

### 3 Ergebnisse

Im ersten Jahr der Studie, 1998, wurden 93 Fledermäuse aus Niedersachsen und eine Fledermaus aus Brandenburg eingesandt. In den folgenden Jahren traten große Schwankungen bezüglich der Anzahl der eingesandten Totfunde und der Beteiligung durch die einzelnen Bundesländer auf (Tab. 1). Bis auf die Jahre 2001 (38) und 2006 (33) konnten jedoch stets zahlreiche Fledermäuse untersucht werden.

Mit insgesamt 541 Tieren wurden im Jahr 2008 die meisten Fledermäuse getestet. Vor allem aus Baden-Württemberg aber auch aus Brandenburg wurde über die Jahre 2003-2009 kontinuierlich Probenmaterial zur Verfügung gestellt. In keinem der Jahre konnte Probenmaterial aus allen 16 Bundesländern gleichzeitig untersucht werden.

Die Menge der Einsendungen je Bundesland variierte sehr stark (Abb. 1). Die meisten

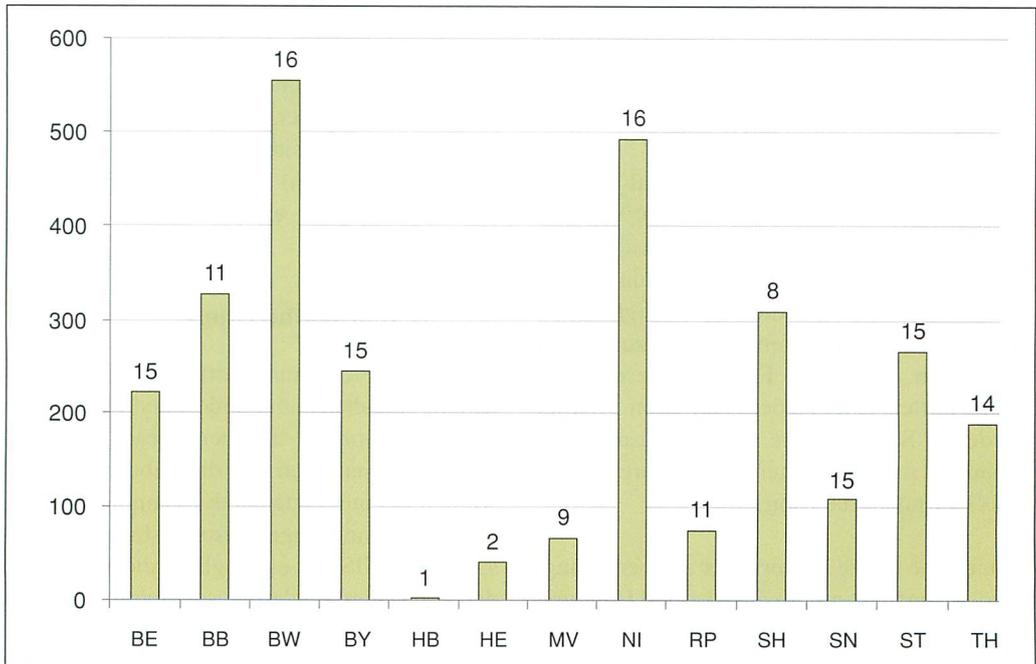


Abb. 1. Einsendungen pro Bundesland und Anzahl der eingesandten Fledermausarten.

Fledermäuse wurden aus den Bundesländern Baden-Württemberg (556 FM) und Niedersachsen (494 FM) zur Untersuchung bereitgestellt. Von beiden Ländern konnten insgesamt 16 verschiedene Fledermausarten im Hinblick auf Fledermaustollwutvirusinfektionen getestet werden.

Von den Bundesländern Saarland, Hamburg und Nordrhein-Westfalen fehlt Probenmaterial, wobei auch aus Bremen (1 FM), Hessen (41 FM) und Rheinland-Pfalz (77 FM) über die Jahre im Vergleich nur wenige Einsendungen zu verzeichnen waren.

Trotz der vergleichsweise geringen Anzahl von Einsendungen (111 FM) aus Sachsen konnten dennoch 15 verschiedene Fledermausarten untersucht werden. Ein gleich großes Artenspektrum war auch bei Proben aus den Bundesländern Berlin, Bayern und Sachsen-Anhalt vertreten. Bei den 311 eingesandten Fledermäusen aus Schleswig-Holstein handelte es sich insgesamt um 8 verschiedene Arten.

Im Zeitraum von 1998-2010 wurden insgesamt 3.021 Fledermäuse untersucht. Dabei war bei einem Anteil von 8,3 % der eingesandten Tiere keine Auswertung möglich, da sie teilweise ausgetrocknet oder in einem anderweitig schlechten Zustand waren. Bei 1,2 % der untersuchten Tiere wurde Tollwut mittels IFT nachgewiesen. Die meisten positiven Tiere wurden in Niedersachsen gefunden. Die Breitflügelfledermaus war dabei die am häufigsten positiv-getestete Art, wobei EBLV-1 als Erreger charakterisiert werden konnte (MÜLLER et al. 2007, FREULING et al. 2008). Bemerkenswert ist der zweite Nachweis von EBLV-2 bei einer Wasserfledermaus aus Magdeburg (FREULING et al., unveröff.).

#### 4 Diskussion

Mit über 3.000 untersuchten Fledermäusen aus fast allen deutschen Bundesländern ist diese Studie trotz alledem einzigartig und verglichen mit der Routinediagnostik aussagekräftiger. Während zwischen 2004 und 2010

in der Routinediagnostik 536 Tiere untersucht wurden, waren es in dieser Studie mit 1.787 mehr als drei Mal so viele Individuen. Obwohl auch die Untersuchung von Totfunden schon eine gewisse Vorauswahl beinhaltet, lässt der nachgewiesene Anteil von ca. 1 % an Tollwut-Positiven eine bessere Schätzung der wahren Prävalenz zu als die an die Untersuchungsämter der Länder eingesandten Tiere. In der Tat ist diese Rate mit 12,31 % genau zehn Mal so hoch (WHO Rabies Bulletin Europe) wie im Vergleichszeitraum dieser retrospektiven Studie. Die in dieser Studie nachgewiesenen EBLV-1 Infektionen bei Breitflügelfledermäusen, vorwiegend aus dem Norddeutschen Tiefland, bestätigen vorangegangene Studien, die eine signifikante Häufung in dieser Region nachweisen (MÜLLER et al. 2007).

Obwohl in Europa zwischen 1977 und 2010 insgesamt 928 Fälle von Fledermaustollwut an das WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) gemeldet worden sind, ist von einer sehr unterschiedlichen Untersuchungsdichte auszugehen (WHO Rabies Bulletin Europe). Diese zu erhöhen und generell zu systematisieren ist unter anderem auch ein Anliegen von EUROBATS und wurde im Jahr 2006 in den Vertragstext mit aufgenommen (Annex 5: Resolution 5.2: Bat Rabies in Europe). Folglich sind die Mitgliedsländer, also auch Deutschland, aufgefordert, Untersuchungen von Fledermäusen auf Tollwut zu etablieren. Diese Studie zeigt, dass die Untersuchungsdichte nach wie vor räumlich und zeitlich inhomogen über Deutschland verteilt ist. Es sollten daher in allen Bundesländern Strukturen und Rahmenbedingungen geschaffen werden, die den Forderungen von EUROBATS Rechnung tragen, und gleichzeitig auch andere Interessen, wie beispielsweise die museale Auswertung und die Kartierung gemäß Natura 2000 berücksichtigen. Das FLI wird diese Studie in den nächsten Jahren fortsetzen und im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geforderten Projektes intensivieren. So soll beispielsweise die morphologische und/oder molekulare Artbestimmung bei der passiven

Surveillance als auch bei der Routineuntersuchung fester Bestandteil werden. Ziel ist es, einen besseren Überblick über das Vorkommen der Fledermaustollwut in Deutschland zu bekommen, um so auch praktische Hinweise an die Fledermausschützer geben zu können.

### Danksagung

Wir möchten uns bei all denjenigen bedanken, die in der Vergangenheit Totfunde gesammelt und an die verschiedenen Untersuchungseinrichtungen eingesandt haben. Besonderer Dank gilt auch dem BMBF (Förderkennzeichen 01K11016A), der Adolf und Hildegard Issler-Stiftung und dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BMELV) für die gewährte Unterstützung.

### Schrifttum

- Anon. (1991): Agreement on the conservation of Populations of Bats in Europe (EUROBATS). Annex 5: bat rabies.
- DEAN, D. J., ABELSETH, M. K., & ATHANASIU, P. (1996): The fluorescence antibody test, p. 88-93. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., & KOPROWSKI, H. (eds.): Laboratory Techniques in Rabies. Vol. 4<sup>th</sup> World Health Organization. Geneva (Switzerland).
- FREULING, C., GROSSMANN, E., CONRATHS, F., SCHAMEITAT, A., KLIEMT, J., AUER, E., GREISER-WILKE, I., & MÜLLER, T. (2008): First isolation of EBLV-2 in Germany. *Veterinary Microbiology* **131**, 26-34.
- MÜLLER, T., & FREULING, C. (2006): Zu Fragen der Fledermaustollwut. *Nyctalus* (N. F.) **11**, 190-197.
- , JOHNSON, N., FREULING, C., FOOKS, A., SELHORST, T., & VOS, A. (2007): Epidemiology of bat rabies in Germany. *Arch. Virology* **152**, 273-288.
- VOS, A., MÜLLER, T., COX, J., NEUBERT, L., & FOOKS, A. R. (2004a): Susceptibility of ferrets (*Mustela putorius furo*) to experimentally induced rabies with European Bat Lyssaviruses (EBLV). *Journ. Veterinary Medicine Ser. B – Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **51**, 55-60.
- , NEUBERT, L., ZURBRIGGEN, A., BOTTERON, C., POHLE, D., SCHOON, H., HAAS, L., & JACKSON, A. C. (2004b): Rabies in red foxes (*Vulpes vulpes*) experimentally infected with European bat lyssavirus type 1. *Ibid.* **51**, 327-332.
- WEBSTER, W. A., & CASEY, G. A. (1996): Virus isolation in neuroblastoma cell culture, p. 93-104. In: MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., & KOPROWSKI, H. (eds.): Laboratory techniques in rabies. Vol. 4<sup>th</sup> World Health Organization. Geneva (Switzerland).
- WHO Rabies Bulletin Europe. Rabies Information System of the WHO Collaboration Centre for Rabies Surveillance and Research, FLI, available at [www.who-rabies-bulletin.org](http://www.who-rabies-bulletin.org).

---

Dr. CONRAD M. FREULING, JULIANE SCHATZ, JEANETTE KLIEMT & Dr. THOMAS MÜLLER, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Epidemiologie, Nationales Referenzlabor für Tollwut, Seestraße 55, D-16868 Wusterhausen

BÄRBEL POTT-DÖRFER, Niedersächsischer Landesbetrieb für Landwirtschaft, Küsten- und Naturschutz/ AB Tier- und Pflanzenartenschutz, Göttinger Chaussee 76, D-30453 Hannover

Dr. DIETRICH HEIDECHE, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Universitätsplatz 10, D-... Halle (Saale)

Dr. GUDRUN WIBBELT & KRISTIN MÜHLDORFER, Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW), Alfred-Kowalke-Straße 17, D-10319 Berlin