

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

IUEPPR

Verbesserung des Verständnisses zur Epidemiologie der Pest der kleinen Wiederkäuer-Erkrankung

Förderkennzeichen: 2813ERA074

Vorhabenlaufzeit: 12.2013 bis 11.2017

KURZDARSTELLUNG

Das IUEPPR-Projekt hat vornehmlich zum Ziel die Rolle von Wildtieren in der Epidemiologie des Virus der Pest der kleinen Wiederkäuer (PPRV) in Afrika, der Türkei und potentiell bei einem Eintrag nach Europa zu untersuchen und damit besser einschätzen zu können. Zur Verbesserung von Überwachungsprogrammen werden schnelle und sensitive diagnostische Tests entwickelt, vorzugsweise unter Verwendung nicht-invasiv genommener Proben. Mittels „next generation sequencing“ (NGS) generierte Vollsequenzen ermöglichen eine Anpassung molekular-diagnostischer Nachweissysteme. Potentielle inter- und intra-Spezies spezifische Sequenzvariationen könnten auf genetische Parameter hinweisen, die Einfluss auf eine Übertragung zwischen Wild- und Nutztieren haben. Zur Identifikation von Übertragungswegen zwischen Wild- und Nutztieren und Pathogenese in unterschiedlichen Wirtsspezies werden tierexperimentelle Studien durchgeführt. Die im Rahmen der Tierversuche generierten Referenzproben, werden wiederum für die Validierung diagnostischer Nachweissysteme verwendet.

VORHABENSCHWERPUNKT UND ERA-NET

Peste-des-petits ruminants (PPR) ist eine wirtschaftlich wichtige Erkrankung von Schafen und Ziegen und eine ernsthafte Bedrohung für Kamele und viele gefährdete Wildtiere, wie Antilopen und Bergziegen. Unser Verständnis der geografischen Verbreitung der Krankheit hat sich durch die Analyse der Ausbreitung von PPR in Afrika, den Nahen Osten und Asien verbessert. Nachdem die Krankheit die Türkei und Marokko erreicht hat, bedroht PPR nun auch Europa.

Eine wichtige Erkenntnis im Rahmen der Eradikation der Rinderpest war, dass Büffel zwar biologisch kompetente Wirte sind, aber aufgrund ihrer Populationsgröße nicht in der Lage sind, das Virus länger als 4 Jahre zu halten und somit als kurzfristiges Reservoir und Vektor für die Infektion anderer Wild-

und Haustierarten dienen. Die Situation bei der PPR ist völlig unbekannt und Annahmen, die auf der Rinderpest basieren, sind nur schwer auf PPR übertragbar, da die Empfänglichkeit verschiedener Tierarten sowie deren Funktion bei der Übertragung des PPRV unterschiedlich sind. Darüber hinaus werden die Erregerübertragung und die Epidemiologie maßgeblich von variablen Zucht- und Vermarktungssystemen, sozialer Organisation und ökologischer Dynamik beeinflusst.

Diese Studie wird sich darauf konzentrieren, unser Wissen über die PPR-Epidemiologie im Feld zu verbessern, indem a) Wildtierpopulationen identifiziert werden, die mit PPR infiziert sind und die als kurz-/langfristige Reservoir für das Virus und/oder als Indikatoren für die Viruszirkulation fungieren können, b) das Risiko identifiziert wird, das PPR für Wildtiere, Nutztiere und die Lebensgrundlage der Landwirte darstellt. Wichtig ist hierbei, dass der schnelle Nachweis von PPR-Virus/Antigen in Wildtier-/Feldproben mit neuen Nachweismethoden, einschließlich Sequenzierungstechniken der nächsten Generation (NGS) und Pathogenitätsstudien an experimentellen Zieltieren, unser Verständnis der Epidemiologie von PPR verbessern kann.

Ziele:

1. Klärung der Rolle von Wildtieren bei der Entstehung von PPR in Afrika, der Türkei und möglicherweise in Europa unter Verwendung eines Risikoanalyse-Ansatzes
2. Verbesserung der Überwachungsmethoden in Wildtierhabitaten unter Verwendung von nicht-invasiven Probenahme-Methoden
3. Entwicklung schneller und empfindlicherer diagnostischer Tests
4. Untersuchung der Pathogenität von PPRV bei Hauswiederkäuern im Rahmen von experimentellen Studien
5. Generierung eindeutiger und vollständiger Genomsequenzen für PPRV unter Verwendung von NGS

ERGEBNISSE

Um die mögliche Rolle von Wildtieren bei der Entstehung von PPR mit Hilfe eines Risikobewertungsansatzes zu untersuchen,

wurden serologische und virologische Proben an der Schnittstelle von Wildtieren und Nutztieren (kleine Wiederkäuer) in Tansania, Kenia, Uganda und Süd Sudan gesammelt. Gleichzeitig wurden auch Daten und Proben aus Kasachstan und der Mongolei gewonnen, wo PPR erst kürzlich in den Jahren 2014 bzw. 2016 aufgetreten ist und im letztgenannten Land mehr als 15.000 Todesfälle bei Nutztieren und eine 54%ige Sterblichkeit bei Wildtierarten wie Steinböcken, Gazellen und Wildschafen verursacht hat. Seren, Tupfer- und Gewebeprobe von Nutztieren mit klinischer PPR wurden auch aus der Demokratischen Republik Kongo, der Elfenbeinküste, Algerien, Marokko, Mosambik und der Türkei gesammelt. Diese Studien zeigten eine Reihe wichtiger Ergebnisse; darunter:

Der epidemiologische Nachweis von PPR bei Wildtieren in Afrika ist immer noch unklar, aber das Vorhandensein von PPR-spezifischen Antikörpern bei Wildtieren in diesen Studien deutet darauf hin, dass ein Übergreifen des Virus von Nutztieren auf Wildtiere ein wichtiges Risiko darstellt, wobei es nur begrenzte Beweise für eine Zirkulation des Virus innerhalb von Wildtierpopulationen gibt. In Afrika scheint das Risiko, dass Wildtiere signifikant zur Persistenz von PPR in endemischen Zonen beitragen, nach unseren Ergebnissen gering zu sein, aber es besteht immer noch die Möglichkeit, dass das Virus möglicherweise durch einige *Bovidae* und afrikanische Büffel übertragen wird. Gezielte Forschung mit einem verbesserten diagnostischen Ansatz ist notwendig, um zu beweisen, dass PPR nicht in Wildtieren erhalten werden und unabhängig zirkulieren kann.

Im Rahmen der schnellen Erkennung von PPR im Feld zur Frühwarnung und Vorbeugung von Ausbrüchen haben wir die Sensitivität neu entwickelter PPRV-RT-PCR-Assays mit fünf veröffentlichten PPRV-RT-PCR-Assays verglichen. Dabei zeigte sich, dass drei der neu entwickelten Assays, die auf das N-, H- oder L-Gen abzielen, und die beiden empfindlichsten veröffentlichten PCR-Assays (Polci et al. 2013, Batten et al. 2011), die auf das N-Gen abzielen, eine ähnliche Sensitivität für den Nachweis von Referenz-PPRV-Stämmen jeder der vier Linien aufweisen. Die Weiterentwicklung des Immunocapture-ELISA wurden an bekannten viralen Linien optimiert und an einer Vielzahl von Matrices validiert, darunter orale, nasale oder rektale Abstriche. Zusätzlich zum *lateral flow device* (LFD) auf der Basis von H-Antikörpern, der in Pirbright validiert wurde, entwickelte CIRAD einen LFD auf der Basis des N-Gens. Der Nachweis des Virus aus Milchproben und Kotproben infizierter Ziegen wurde als nicht-invasive Methode der Probengewinnung gezeigt.

Um die molekulare Epidemiologie von PPR zu untersuchen, haben wir zum ersten Mal die Viren der Linie III sequenziert und unter Verwendung der gesamten Genomsequenzen aller vier Linien weltweit die Evolutionsrate (die Nukleotid-Substitutionsrate und das ungefähre Jahr der Entstehung von PPRV) geschätzt. Ein phylogeographischer Ansatz schätzte die Wahrscheinlichkeit für das erste Auftreten der einzelnen Linien; Senegal für Linie I, Nigeria/Ghana für Linie II, Sudan für Linie III und Indien für Linie IV. Wir fanden heraus, dass die mittlere evolutionäre Substitutionsrate des kompletten PPRV-Genoms auf $9,09 \times 10^{-4}$ (95% HPD $2,13 \times 10^{-4}$ - $1,64 \times 10^{-3}$) geschätzt wurde.

Des Weiteren haben wir das Protokoll für die Next-Generation-Sequenzierung von PPR-Viren standardisiert. Die Arbeit wurde in dem Bemühen durchgeführt, einen kosteneffektiven Ansatz zur Sequenzierung des gesamten PPRV-Genoms mit einer robusten, einfachen und zuverlässigen Methodik zu entwickeln, um vollständige Genomsequenzen aus originalem klinischem Material und kultivierten Proben zu erhalten. Zusätzlich zur vollständigen Genomanalyse haben wir durch die Durchführung einer partiellen N-Gen-Analyse von PPR-Viren in verschiedenen Teilen der Welt die Verwandtschaft der Viren untereinander und die grenzüberschreitenden Bewegungen aufgezeigt.

Im Projekt war das Friedrich-Loeffler-Institut in den Arbeitspaketen 2 (Rapid detection of PPR in the field for early warning and prevention of outbreak), 3 (Molecular epidemiology of PPR using next-generation sequencing technology) und 4 (Host specific pathogenicity studies for PPR) involviert. Die Optimierung der molekularen Diagnostik von PPRV stand im Fokus des Arbeitspaketes 2. Es konnte gezeigt werden, dass virale RNA nach PPRV-Infektion bis zu 3 Wochen bei Schweinen, bis zu 11 Wochen bei Ziegen, mindestens 3 Wochen bei Schafen und bis zu 2 Wochen bei Neuweltkameliden in unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien nachgewiesen werden kann. Die real-time PCR stellt damit das sensitivste Nachweisverfahren von PPRV dar. Im Arbeitspaket 3 wurde ein standardisiertes Protokoll für die Vorbereitung von Proben zur PPRV-Volllänge-Sequenzierung mittels *next-generation sequencing* entwickelt und kann für aktuelle und zukünftige Ausbruchsanalysen genutzt werden. Im Rahmen des Arbeitspaketes 4 wurden umfassende Pathogenese-Studien in verschiedenen Tierarten mit PPRV durchgeführt.

FAZIT

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tierversuche mit Rindern, Kameliden, Schafen, Ziegen, Haus- und Wildschweinen sehr bedeutende Unterschiede in der Ausscheidungsdynamik und Pathogenese aufzeigten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rinder und Kameliden *dead-end' hosts* für PPRV der Linie 4 sind. Im Gegensatz dazu können PPRV-infizierte Schweine und Schafe infektiöses PPRV auf Kontakttiere übertragen und aufgrund der milden bis moderaten klinischen Symptome zur unbemerkten Verbreitung von PPRV beitragen. Ein geschlossener Übertragungszyklus von PPRV zwischen Schweinen und Ziegen konnte im Tierversuch gezeigt werden. Die tatsächliche Rolle der Schweine und Wildschweine in der Epidemiologie von PPRV sollte unbedingt weiter untersucht werden.

PUBLIKATIONEN

Schulz C, Fast C, Schlottau K, Hoffmann B, Beer M. Neglected Hosts of Small Ruminant Morbillivirus. *Emerg Infect Dis.* 2018 Dec;24(12):2334-2337. doi: 10.3201/eid2412.180507.

Schulz C, Fast C, Wernery U, Kinne J, Joseph S, Schlottau K, Jenckel M, Höper D, Patteril NAG, Syriac G, Hoffmann B, Beer M. Camelids and Cattle Are Dead-End Hosts for Peste-des-Petits-Ruminants Virus. *Viruses.* 2019 Dec 8;11(12). pii: E1133. doi: 10.3390/v11121133.

Projektbeteiligte:

Friedrich-Loeffler-Institut – Deutschland, IAEA – Österreich, SLU – Schweden, TPI – Vereinigtes Königreich, CIRAD – Frankreich, SVA – Schweden, KVI – Israel, CIRAD – Frankreich, RVC – Vereinigtes Königreich, CIRAS-Bios – UMR ASTRE – Frankreich

Kontakt:

Prof. Dr. Martin Beer, +49 38351 7200, martin.beer@fli.de, Südufer 10 – 17493 Greifswald-Insel Riems, <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-virusdiagnostik-ivd/>