

„Lovely RITA...“ – FLI Methodenentwicklung erlaubt Charakterisierung von 25 Subtypen aviärer Influenzaviren auf einen Streich

Ann Kathrin Ahrens, Timm Harder

FLI, Institut für Virusdiagnostik, Nationales Referenzlabor für Aviäre Influenza



Anne Kathrin Ahrens
(© J. King, FLI)

Aviäre Influenzaviren (AIV) werden der Virusfamilie der *Orthomyxoviridae*, Genus *Influenza A*, zugeordnet. AIV zeichnen sich durch ein okto-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom negativer Orientierung aus, das neben den beiden charakteristischen Oberflächenproteine, Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), noch für mindestens acht weitere virale Proteine kodiert. Im Zuge der weiteren taxonomischen Einordnung werden

AIV in insgesamt 16 verschiedene HA- und 9 verschiedene NA-Subtypen differenziert. Aquatisch lebende Wildvögel stellen das natürliche Reservoir aller AIV Subtypen dar. Innerhalb der Subtypen H5 und H7 werden Pathogenitätsvarianten unterschieden: Hochpathogene (high pathogenicity, HP) AIV induzieren rasch tödlich verlaufende systemische Infektionen in Hühnervögeln (anzeigepflichtige hochpathogene aviäre Influenza, Geflügelpest) und gehen ursprünglich durch Mutationen im Bereich einer proteolytischen Spaltstelle im HA Protein aus ihren niedrigpathogenen (low pathogenicity, LP) Vorläuferviren hervor. Eine umfassende AI Diagnostik bedarf also des generischen Erregernachweises, seiner HA und NA Subtypisierung sowie im Falle von H5 und H7 deren Pathotypisierung.

Seit 2006 wurden in Deutschland gehäuft HPAIV Infektionen des aus Asien stammenden H5N1 Virus und seiner diversen Nachkommen bei Wildvögeln und Geflügel detektiert. Seit 2016 wird eine drastische Zunahme des Infektionsdrucks beobachtet. Dies führte zu sprunghaft gestiegenen Ausbruchsfällen bei Geflügel und Zoovögeln und bedingt auch erheblichen wirtschaftlichen Schaden. Parallel steigende Fallzahlen tödlich verlaufender Infektionen bei Wildvögeln betreffen auch streng geschützte Arten wie Wanderfalken und Seeadler, deren Bestand dadurch bedroht werden könnte. Eine schnelle und vollständige molekularbiologische Diagnostik ist unabdingbar, um tierseuchenrechtliche Restriktionsmaßnahmen zur Ausbruchstilgung und zur Vermeidung der weiteren Erregerverbreitung gezielt und unverzüglich einleiten zu können.

Riems Influenza A Typing Array – RITA

Seit 2014 wurde am FLI an Entwicklungen eines „Riems Influenza A Typing Array“, kurz RITA, gearbeitet und eine erste Version 2016 publiziert (1). Das System stellt einen Array Subtyp-spezifischer einzelner RT-qPCRs zur Verfügung, die parallel gestartet werden. In vorgefertigten, tiefgefrorenen PCR Platten sind bereits alle Primer und Sonden einpipettiert, so dass bei Bedarf lediglich die PCR-Chemie sowie das RNA Target mit einer Mehrkanalpipette hinzu pipettiert

werden müssen (Abb.). Optional kann auch eine interne Kontrolle (IC-2) parallel gefahren werden. Nach etwa 1:45 Stunden steht das Ergebnis bereit. Das originäre RITA-1-System benötigte insgesamt 32 Vertiefungen, um 14 HA- und 9 NA-Subtypen zu differenzieren. Eine Auskopplung aus dem RITA-1-System stellt der NA-RITA-1 dar, welcher lediglich die 9 NA-Subtypen umfasst und bei Proben mit bereits bekanntem HA-Subtyp Verwendung fand.

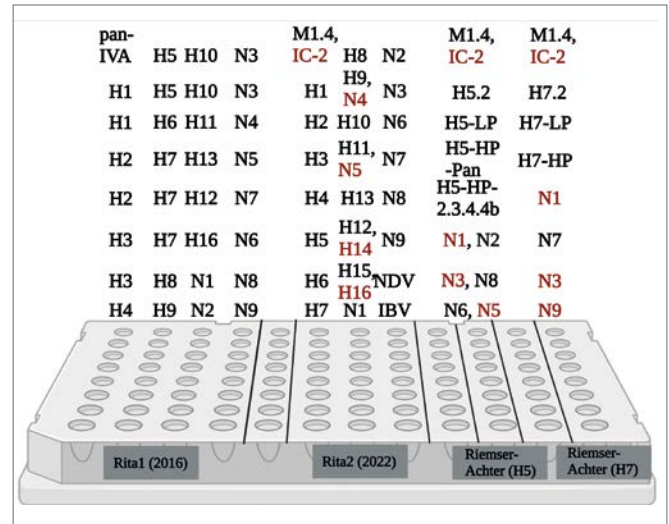


Abb.: Entwicklung der Riemser Influenza Typisierungs Assays (RITA) seit 2014 im Vergleich der Plattenbelegungen. Schwarze und rote Beschriftungen bezeichnen die Detektion des Targets im real time RT-PCR Verfahren im FAM- bzw. HEX-Kanal. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt (Publikationslizenz NQ23R08GTU).

Das bestehende RITA-1-System wurde nun grundlegend modernisiert und ökonomischer gestaltet. Primer- und Sondensequenzen wurden an die seit 2016 sich weiter diversifizierende genetische Vielfalt der AIV adaptiert. Statt 32 müssen nun noch 24 RT-qPCRs parallel gefahren werden, um nunmehr 16 HA und 9 NA AIV Subtypen sowie Newcastle Disease Virus (NDV) und Infektiöses Bronchitisvirus (IBV) nachzuweisen. Wie auch im vorherigen System dient eine IC-2-RT-qPCR als interne Kontrolle (Abb.). Dieser RITA-2 Array verwendet weiterhin einen auf 12.5 µL reduzierten PCR Ansatz, was zur weiteren Kosteneffizienz beiträgt (2).

Die Verfügbarkeit von 25 RT-qPCRs aus dem RITA-2 Array, die mit hoher Sensitivität und Spezifität einen einzelnen AIV Subtyp detektieren, bietet ideale Möglichkeiten eine der jeweiligen epidemiologischen Situation angepasste Auswahl dieser PCR's zusammenzustellen. Ein solches System, der sogenannte „Riemser Achter“, wurde beispielhaft für Epidemien mit H5 und H7 AIV validiert und reduziert die parallel anzusetzende Zahl der RT-qPCRs auf acht (Abb.). Darüber hinaus erfolgt im gleichen Ansatz auch eine Pathotypisierung (HP oder LP) auf der Basis von RT-qPCRs, die auf die Sequenz der HA Spaltstelle gerichtet sind (3, 4). In der gegenwärtigen H5N1 HPAIV Epidemie wurde das System noch rigoroser auf nur noch vier essentielle RT-qPCRs reduziert: Generische AIV-PCR, H5, N1, HPH5 (clade 2.3.4.4b). Der gleichzeitige Ansatz dieser PCR's für jede der in den

Landesuntersuchungseinrichtungen H5-positiv getesteten Probe erlaubt die vollständige Diagnose auch größerer Probenmengen innerhalb eines Arbeitstages.

Zusammenfassend stellt das RITA-2-System eine optimierte Subtypen-spezifische Diagnostik von AI-Infektionen bei Wildvögeln und Geflügel zur Verfügung. Flankiert von RT-qPCRs zur Pathotypisierung von Viren der Subtypen H5 und H7 sowie den bei Geflügel differentialdiagnostisch zu beachtenden NDV und IBV sichern diese RT-qPCR die Handlungsfähigkeit eines personell knapp besetzten Referenzlabors auch bei höherem Probendurchsatz.

Literatur

Hoffmann B, Hoffmann D, Henritzi D, Beer M, Harder TC. Riems influenza a typing array (RITA): An RT-qPCR-based low density array for subtyping avian and mammalian influenza a viruses. *Sci Rep.* 2016; 6: 27211.

Hassan KE, Ahrens AK, Ali A, El-Kady MF, Hafez HM, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). *Viruses.* 2022; 14: 415.

Naguib MM, Graaf A, Fortin A, Luttermann C, Wernery U, Amarín N, Hussein HA, Sultan H, Al Adhah B, Hassan MK, Beer M, Monne I, Harder TC. Novel real-time PCR-based patho- and phylogeny of potentially zoonotic avian influenza A subtype H5 viruses at risk of incursion into Europe in 2017. *Euro Surveill.* 2017; 22: 30435.

Graaf A, Beer M, Harder T. Real-time reverse transcription PCR-based sequencing-independent pathotyping of Eurasian avian influenza A viruses of subtype H7. *Virology.* 2017; 14: 137.

FLI-Team entwickelt FAO-Onlinekurses - Bessere Vorbeugung und Bekämpfung der Geflügelpest durch E-Learning

Annika Graaf für das FLI-Team*

FLI, Institut für Virusdiagnostik, Nationales Referenzlabor für Aviäre Influenza



Annika Graaf
(© J. King, FLI)

Aviäre Influenzaviren (AIV) bleiben weltweit eine der dominantesten und komplexesten Tiergesundheitsgefahren mit weitreichenden Auswirkungen für alle Sektoren der Geflügelproduktion. Zur Vermittlung von fundierten Kenntnissen zur Virologie, Diagnostik, Epidemiologie, Vorbeugung und Bekämpfung der Geflügelpest entwarf ein Autorenteam des FLI im Auftrag der FAO E-Learning Unterlagen. Darauf aufbauend wurde in einem Pilotformat

vom 18.01. bis 22.02.2022 unter Leitung der FAO und in Begleitung des FLI-Teams ein kostenloses FAO-Online-Training zum Thema "Avian Influenza Preparedness" durchgeführt.

Modularer Aufbau

Hierzu bereitete das FLI gemeinsam mit dem virtuellen Lernzentrum der FAO in Rom Material für acht Module vor (entspricht 12 Stunden Vorlesung). In diesen durch audiovisuelles Material unterstützten Online-Modulen hatten die Teilnehmenden nach einem interaktivem Einführungs-Webinar insgesamt fünf Wochen lang die Möglichkeit, sich über die Auswirkungen und Bedeutung der Geflügelpest, Epidemiologie, Pathogenese und klinische Diagnose, Labordiagnose, Untersuchung von Ausbrüchen, Prävention, Überwachung sowie Bekämpfung zu informieren (Abb.). Zur Selbsteinschätzung der Teilnehmenden wurden am Ende eines jeden Moduls Fragen mit anschließender Auflösung bereitgestellt.

Zudem standen den Teilnehmenden kursbegleitend und in einem abschließenden Webinar das FLI-Team sowie weitere internationale AIV-Expert:innen in einem Diskussionsforum zur Verfügung, um Fragen zu beantworten, wertvolles Feedback zu geben und interaktive Diskussionen anzuregen. Eine Strategie zur Anregung von Diskussionen bestand darin, den Teilnehmenden wöchentlich Fragen zu stellen, z. B. zu länderspezifischen Risikofaktoren, individuellen Erfahrungen mit verschiedenen Testmethoden, Ausbruchsuntersuchungen und der Akzeptanz von Biosicherheitsmaßnahmen bei Geflügelhaltern oder auf Lebendgeflügelmärkten. Insgesamt gab es rund 100 zusätzliche von den Teilnehmenden initiierte Diskussionsthemen, die z.T. intensiv (und kontrovers) diskutiert wurden, wie z. B. die Impfung von Geflügel. Die meisten Fragen wurden zu den Themen „Diagnostik“ und „Virusübertragung“ gestellt. Persönliche Erfahrungen der Teilnehmenden offenbarten, dass die Gegebenheiten in den einzelnen Ländern so unterschiedlich sind, dass standardisierte Vorgehensweisen zur Bekämpfung vermutlich nicht wirksam sein können, sondern immer den örtlichen Realitäten angepasst werden müssen.

Sehr gute Resonanz

Die Schulung richtete sich weltweit vor allem an Tierärzt:innen, die in staatlichen Veterinärdiensten arbeiten und direkt an der Überwachung, Erkennung, Vorbeugung sowie Bekämpfung der Geflügelpest beteiligt sind. Das übergeordnete Ziel des Kurses bestand darin, die Kapazitäten der Länder in diesen Bereichen zu stärken. Der Kurs stieß auf großes Interesse: Insgesamt nahmen etwa 500 Veterinäre aus 98 Mitgliedsländern in den FAO-Regionen Afrika, Asien und Pazifik, Europa und Zentralasien, Lateinamerika und Karibik sowie Naher Osten und Nordafrika teil. Die erfolgreiche Absolvierung aller Module, inklusive der geforderten aktiven Beteiligung im Diskussionsforum, wurde mit einem Zertifikat doku-