

Aktuelles zu Rustrelavirus-Infektionen bei Wild- und Zootieren im Nordosten Deutschlands

Angele Breithaupt und Dennis Rubbenstroth

FLI, Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit/Labor für Pathologie I, Institut für Virusdiagnostik/Labor für phylogenetische Analysen



Angele Breithaupt
(© privat)

Erstbeschreibung RusV-assoziierter Todesfälle bei Zootieren in Stralsund

Das Rustrelavirus (RusV; Spezies *Rubivirus strelense*), ein neu entdeckter Verwandter des Rötelnvirus (Rubellavirus, RuV; *Rubivirus rubellae*), wurde erstmals 2020 als ein tödlicher Krankheitserreger bei Zootieren in Stralsund, im Nordosten Deutschlands beschrieben (1).

Vor der Entdeckung des RusV und des verwandten Ruhuguvirus (RuhV; *Rubivirus ruteetense*) war das Rötelnvirus das einzige Mitglied der Gattung *Rubivirus*, Familie *Matonaviridae*. Das hochansteckende Rötelnvirus kommt weltweit, jedoch ausschließlich beim Menschen vor. RusV wurde initial post mortem im Hirngewebe von einem Esel (*Equus asinus*), einem Wasserschwein (*Hydrochoerus hydrochaeris*) und einem Bennett-Känguru (*Macropus rufogriseus*) entdeckt. Alle drei Zootiere zeigten schwere neurologische Krankheitsanzeichen (u. a. Ataxie, Krämpfe, Lethargie) und entwickelten eine nichteitrige Meningoenzephalitis. Im Rahmen der Schadnagerbekämpfung im und um das Zoogelände konnte RusV außerdem im Hirngewebe von Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*), aber bei keinem anderen Kleinsäuger, identifiziert werden. Im Gegensatz zu den Zootieren lagen bei diesen Nagern keine Hinweise für eine Meningoenzephalitis vor (siehe auch LabLoeffler 21/2020).

Weitere Fälle bei Zoo- und Wildtieren nun auch in Zoos bei Paaren und Perleberg

Seither wurde das RusV zunächst bei drei weiteren Fällen von tödlicher Meningoenzephalitis in Stralsund nachgewiesen: neben einem südamerikanischen Nasenbären (*Nasua nasua*) sowie einem zweiten Bennett-Känguru aus dem Zoo fand sich in unmittelbarer Nähe der Einrichtung ein europäischer Otter (*Lutra lutra*), der kurz nach Verbringung im Zoo verstarb (2). Beide Tiere zeigten abnorme Bewegungsabläufe, der Otter zusätzlich einen Verlust der natürlichen Scheu.

Darüber hinaus wurden Fälle von RusV-assoziierter Meningoenzephalitis erstmals auch in anderen Zoos in Nordostdeutschland entdeckt, in den Regionen Paaren und Perleberg in Brandenburg (3). In beiden Fällen handelt es sich wiederum um Bennett-Kängurus. Dank der engen Zusammenarbeit mit den Zoos, den zuständigen Landesuntersuchungseinrichtungen (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei M-V, LALLF; Landeslabor Berlin-Brandenburg, LLBB) bzw. der Tierpathologie der Freien Universität Berlin konnten weitere Details zur Verbreitung des Virus und zum Krankheitsverlauf insbesondere bei

Bennett-Kängurus beschrieben werden. Alle RusV-infizierten Bennett-Kängurus zeigten plötzliche Anzeichen einer therapieresistenten neurologischen Erkrankung mit einem breiten Spektrum neurologischer Krankheitsanzeichen, die vor allem den Bewegungsapparat betrafen. Daneben wurde auch Nasenausfluss dokumentiert. Bemerkenswert war, dass sowohl im Zoo bei Perleberg als auch bei Paaren bereits zuvor tödliche Krankheitsfälle bei je einem Känguru aufgetreten waren (2019 und 2020), die jedoch nicht ätiologisch abgeklärt wurden.

Gesamtschau der bisherigen Befunde aus allen bislang veröffentlichten Studien

RusV-Genom wurde bei allen Fällen mittels spezifischer RT-qPCR im Gehirn nachgewiesen, während in anderen Geweben nur vereinzelt sehr geringe Mengen viraler RNA nachzuweisen waren. Durch RNA-in-situ-Hybridisierung (RNA-ISH) konnten Neuronen als hauptsächliche Zielzellen identifiziert werden. Die histopathologische Untersuchung zeigte in allen Fällen eine nichteitrige Meningoenzephalitis mit perivaskulären und im Gewebe verteilten Immuneinfiltraten sowie wenigen Mikrogliaknötchen. Nur in Einzelfällen konnten in geringem Ausmaß neuronale Degenerationen und Nekrosen nachgewiesen werden und es lagen keine Hinweise für eine Entmarkung (Demyelinisierung) im Gehirn vor. Es konnten nur sehr wenige, aktive-Caspase 3 markierte, apoptotische Zellen intraläsional gefunden werden. In den entzündlichen Infiltraten dominierten CD3-positive T-Zellen, daneben fanden sich zahlreiche IBA1-positive Mikrogliazellen bzw. infiltrierende Makrophagen. Ferner zeigten GFAP-markierte Astrozyten bei einigen Tieren Anzeichen einer Aktivierung (plumpe Zellform). Zum Teil lagen Hinweise für intravitale Blutungen vor (positive Berliner Blau Reaktion), die möglicherweise auf stumpfe Traumata zurückzuführen sein könnten, etwa aufgrund unkoordinierter Bewegungen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (siehe Abb. 1 und Abb. 2). Bemerkenswerterweise bestand zum Teil kein direkter räumlicher Zusammenhang zwischen dem Nachweis von RusV-RNA mittels RNA-ISH und der Entzündungsreaktion bzw. den Mikrogliaknötchen. So konnte in einigen Hirnarealen abundant virales Genom, jedoch keine offensichtliche Gewebsreaktion identifiziert werden.

Unklar bleibt, ob der teils schlechte Ernährungszustand einiger Tiere auf einen längeren Krankheitsverlauf hindeutet. Offensichtliche neurologische Anzeichen traten meist erst kurz vor der Euthanasie bzw. dem Tod auf.

Die Beschränkung der Läsionen und des Virusnachweises auf das Gehirn ist typisch für Spill-over-Wirte von Neuropathogenen wie z. B. auch dem Borna disease virus 1 (BoDV-1), dem Erreger der Bornaschen Krankheit. Bei den infizierten und erkrankten Zoo- und Wildtieren handelt es sich vermutlich um Sackgassenwirte, die das Virus vermutlich nicht ausscheiden und somit auch nicht zur Verbreitung des Virus beitragen. Die Bedeutung der scheinbar gesunden Gelbhalsmäuse als mögliche Reservoirwirte des Virus ist Gegenstand aktueller Studien. Diese Beobachtungen und Hypothesen

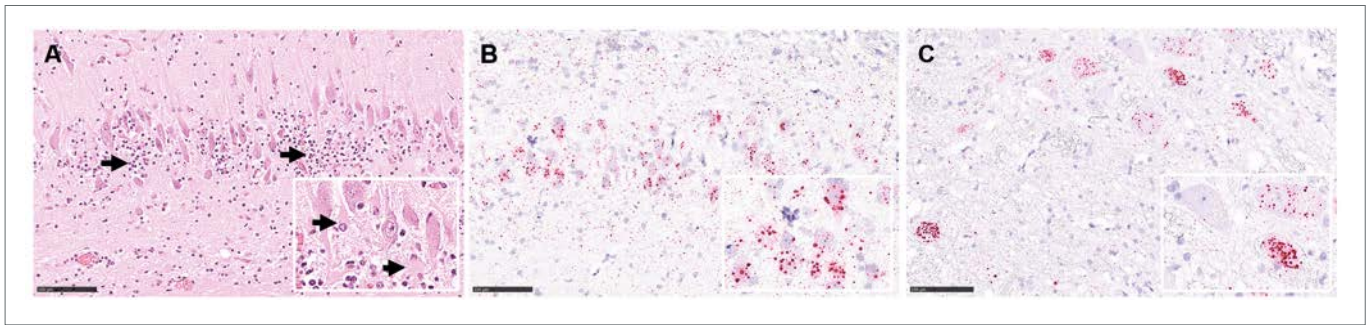


Abb. 1: Histopathologie und Virusgenomnachweis einer RusV-assoziierten Meningoenzephalitis bei einem eurasischen Fischotter (*Lutra lutra*) und einem südamerikanischen Nasenbären (*Nasua nasua*). (A) Nichteitrige Meningoenzephalitis in der Hippocampus-Region des Otters, mit mononukleären Infiltraten (Pfeile) und Verlust von Nissl-Substanz, was auf neuronale Degeneration hinweist, HE-Färbung. (B-C) Nachweis von RusV-RNA in Neuronen der Hippocampusregion des Otters (B) sowie des Hirnstamms des Nasenbären (C), RNA-ISH, chromogene Markierung (Rot) mit Sonden für die kodierende Region des Nichtstrukturproteins p200 Polyprotein von RusV, Mayers Hämatoxylin-Gegenfärbung. Maßstabsbalken 100 µm.

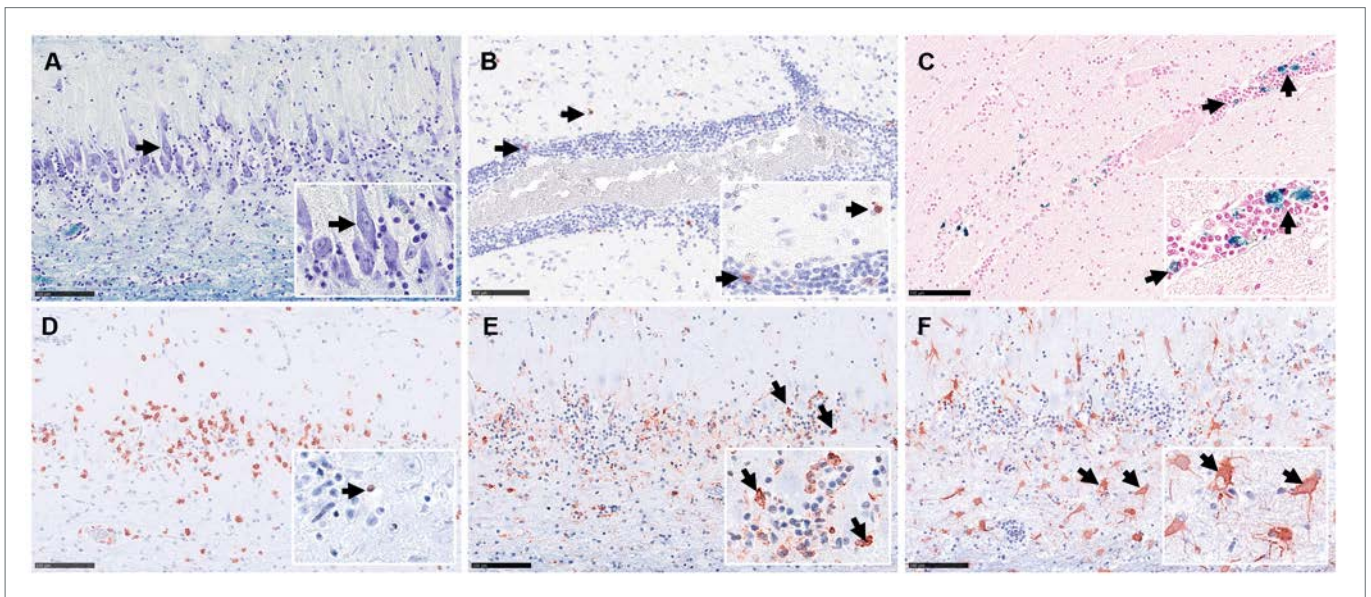


Abb. 2: Spezialfärbungen und immunhistochemische Markierung bei Fällen RusV-induzierter Meningoenzephalitis, exemplarisch hier beim Fischotter im Hippocampus (A, D-F) und im Kortex (B, C). (A) Verlust von Nissl-Substanz mit zentraler Chromatolyse (Pfeil), die auf neuronale Degeneration hinweist, Luxol-Fastblue-Cresylviolett-Färbung. (B) Wenige aktive Caspase-3-immunreaktive (Pfeile) apoptotische Zellen. (C) Multifokal perivaskuläre Makrophagen, positiv für 3-wertiges Eisen in der Berliner-Blaureaktion (Pfeile), was auf eine intravitale Blutung hinweist. (D) Zahlreiche infiltrierende CD3-markierte T-Lymphozyten, aber nur einzelne CD79a-markierte B-Zellen in der gleichen Region (Detaildarstellung mit Pfeil). (E) Hohe Anzahl plumper, IBA-1 immunreaktiver (Pfeile) Mikrogliazellen bzw. Makrophagen. (F) Zahlreiche GFAP-markierte Astrozyten (Pfeile) mit plumper Zellform, die auf eine astrogliale Aktivierung hinweist. (B, D-F) Immunhistochemie, 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, rotbraun), Mayer's Hämatoxylin Gegenfärbung. Maßstabsbalken 100 µm.

müssen ggf. Neubewertet werden, wenn ausreichend Daten über die Inkubationszeit von RusV und weitere Faktoren, die die Infektion beeinflussen könnten, zur Verfügung stehen. RusV infiziert nachweislich ein breites Spektrum von Säugetierwirten. Die sowohl in zoologischen Gärten als auch in Privathaltungen beliebten Bennett-Kängurus scheinen aus bislang ungeklärter Ursache besonders anfällig für RusV-Infektionen zu sein. Grundsätzlich sollte RusV als ätiologische Differentialdiagnose für neurologische Erkrankungen bzw. nichteitrige Meningoenzephalitiden in Deutschland in Betracht gezogen werden. In betroffenen Einrichtungen und Regionen sind Präventionsstrategien, wie Schädnerbekämpfung, zu empfehlen.

Aufruf zur Zusammenarbeit

Um die Pathogenese dieser neuen Krankheit und die epidemiologische Bedeutung der betroffenen Spezies zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Labore für Pathologie und das Nationale Referenzlabor für Bornavirus-Infektionen der Tiere am FLI sind daher interessiert an Fällen nichteitriger Meningoenzephalitis, bei denen bisherige Routineuntersuchungen keine Ursache identifizieren konnten. Von besonderem Interesse ist hierbei eingefrorenes Frischmaterial, Untersuchungen an Formalin-fixiertem Gewebe sind allerdings auch möglich.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei allen Ko-Autoren der in diesem Artikel zusammengefassten Studien. Kathrin Steffen, Weda Hoffmann, Silvia Schuparis, Robin Brandt, Gabriele Czerwinski und Patrick Zitzow danken wir für die hervorragende technische Unterstützung. Ein Teil der Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert (Projekt RubiZoo, Förderkennzeichen 01KI2111).

Kontakt

Angele Breithaupt

Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit
Angele.breithaupt@fli.de

Dennis Rubbenstroth

Institut für Virusdiagnostik
Dennis.Rubbenstroth@fli.de

Literatur

Bennett AJ, Paskey AC, Ebinger A, Pfaff F, Priemer G, Hoper D, Breithaupt A, Heuser E, Ulrich RG, Kuhn JH, Bishop-Lilly KA, Beer M, Goldberg TL. 2020. Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature* 586:424–428.

Pfaff F, Breithaupt A, Rubbenstroth D, Nippert S, Baumbach C, Gerst S, Langner C, Wylezich C, Ebinger A, Hoper D, Ulrich RG, Beer M. 2022. Revisiting Rustrela Virus: New Cases of Encephalitis and a Solution to the Capsid Enigma. *Microbiology Spectrum* 10.

Voss A, Schlieben P, Gerst S, Wylezich C, Pfaff F, Langner C, Niesler M, Schad P, Beer M, Rubbenstroth D, Breithaupt A, Mundhenk L. 2022. Rustrela virus infection – An emerging neuropathogen of Red-necked wallabies (*Macropus rufogriseus*). *Transboundary and Emerging Diseases* DOI: 10.1111/tbed.14708.

Serologisches Screening bei Wildwiederkäuern in Deutschland, 2021/22: Kein Hinweis auf das Vorkommen von SARS-CoV-2

Kerstin Wernike und Martin Beer

FLI, Institut für Virusdiagnostik, WOAH Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhoe und Nationales Referenzlabor für Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease und Schmallenberg-Virus



Kerstin Wernike
(© W. Maginot, FLI)

Coronavirus-Serologie

Das aktuelle COVID-19-Pandemiegeschehen, verursacht durch SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2), zeigt, dass Tiere einen wichtigen Faktor in der Dynamik von Infektionskrankheiten darstellen. Vom wahrscheinlichen Ursprung von SARS-CoV-2 in tierischen Reservoirwirten bis zur Gefahr der Etablierung von separaten Übertragungszyklen in Haus-,

Nutz- oder Wildtieren spielen Tiere eine wichtige epidemiologische Rolle. Umfangreiche experimentelle Studien, auch am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), haben gezeigt, dass einige Tierspezies wie beispielsweise Goldhamster, Frettchen und Marderhunde empfänglich für eine Infektion mit SARS-CoV-2 sind, während andere Tierspezies wie Rinder, Schweine, Hühner und Enten kaum bzw. nicht empfänglich sind. Aus der Situation im Feld hat sich zudem gezeigt, dass amerikanische Nerze in Pelztierfarmen eine sehr hohe Empfänglichkeit zeigen. Weiterhin haben experimentelle Infektionsstudien und Feldbeobachtungen in Nordamerika ergeben, dass Weißwedelhirsche hoch empfänglich sind, SARS-CoV-2 effizient vermehren und ausscheiden können und dabei auch Kontakttiere infizieren. Serologische Untersuchungen haben gezeigt, dass ein sehr hoher Prozentsatz von Weißwedelhirschproben aus den Jahren 2020 bis 2022 Antikörper gegen

SARS-CoV-2 aufweist. In-silico-Modellierungen – basierend auf der Aminosäurezusammensetzung und Struktur des SARS-CoV-2-Rezeptors ACE2 – geben einen Hinweis darauf, dass andere Hirschartige (Cerviden) ebenfalls empfänglich für SARS-CoV-2 sein könnten.

Um abschätzen zu können, ob auch europäische Wildwiederkäuerarten betroffen sind, wurden zwischen September 2021 und Januar 2022 in fünf deutschen Bundesländern von Reh-, Rot-, Dam- und Muffelwild und einem Wisent gesammelte Proben serologisch untersucht. Die Probenherkunft und Tierzahl pro Spezies ist der Abb. 1 zu entnehmen. Weiterhin wurden insgesamt 307 Reh-, Rot- und Damwildseren getestet, die zwischen 2017 und 2020 in drei Truppenübungsgebieten der Bundeswehr gesammelt wurden. Von den untersuchten Spezies sind die Rehe die nächsten Verwandten der Weißwedelhirsche (beides Trughirsche [Capreolinae]), Rothirsche und Damhirsche gehören zu den echten Hirschen (Cervinae). Als Screeningtest kam ein ELISA zum Einsatz, der auf der Rezeptor-bindenden Domäne (RBD) von SARS-CoV-2 basiert. Positiv reagierende Proben wurden mittels Neutralisationstest und einem kommerziellen Surrogat-Virus-Neutralisationstest (SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test (svNT) Kit, GenScript) untersucht. Im RBD-basierten ELISA reagierten 25 der 493 (5,1 Prozent; 95 Prozent CI: 3.1 – 7.0 Prozent) im Herbst und Winter 2021/22 gesammelten Wildwiederkäuerproben positiv (Abb.1). Diese Seroreaktivität konnte allerdings in keinem Fall mittels des hochspezifischen Neutralisationstests bestätigt werden. Außerdem trat eine solche Reaktivität auch bei Proben aus den Jahren 2017, 2018 und 2019 auf.

Um zu untersuchen, ob die Reaktivität gegen die RBD von SARS-CoV-2 durch Antikörper gegen ein anderes, bisher unbekanntes Coronavirus des Subgenus Sarbecovirus