

„Schmallenberg-Virus“

Ein neues Virus in Europa

von Dirk Höper¹, Kerstin Wernike¹, Michael Eschbaumer¹, Franz Conraths², Bernd Hoffmann¹, Horst Schirmer¹, Elke Reinking¹ und Martin Beer¹

Mit Proben von drei Milchkühen aus einem Bestand nahe der Stadt Schmallenberg gelang durch den Einsatz einer neuartigen und aufwändigen Untersuchungsmethode die Entdeckung eines neuen Virus aus der Simbu-Serogruppe. Im Folgenden soll das hierfür genutzte Verfahren der Metagenomanalyse näher erläutert werden, gefolgt von ausgewählten Informationen zum Schmallenberg-Virus und der epidemiologischen Situation zu den Schmallenberg-Virus-Infektionen in Deutschland.

Im Sommer und Herbst 2011 wurden vermehrt Proben von Milchkühen an das Institut für Virusdiagnostik am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Insel Riems, gesandt. Hoftierärzte und betroffene Landwirte vermuteten die Rückkehr der Blauzungkrankheit. Bei den Tieren waren kurzzeitige milde Symptome wie Milchrückgang und Fieber beobachtet worden. Ähnliche Berichte kamen aus den Niederlanden, wobei dort zusätzlich Durchfälle eine wichtige Rolle spielten.

Nachdem einige der bisher in Europa bei Rindern relevanten Tierseuchen wie Blauzungkrankheit, Bovine Virusdiarrhoe sowie die Bovine Herpesvirus Typ 1-Infektion und Maul- und Klauenseuche ausgeschlossen worden waren, wurden zusätzliche Untersuchungen auf Rift-Valley-Fieber und bovines Ephemeralfieber mit ebenfalls negativem Ergebnis durchgeführt.

Metagenomanalyse als Schlüssel der Virusentdeckung

Die Metagenomanalyse ermöglicht die Spezifizierung aller in einer Probe vorkommenden eukaryontischen Zellen, Bakterien und Viren. Zu diesem Zweck wird das gesamte Erbgut (Genom = Gesamtheit aller Gene) aus der Probe sequenziert und mit anderen Genomen aus einer Datenbank verglichen. Die Genome der unterschiedlichen Organismen und Viren unterscheiden sich in der Abfolge der Basen Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin innerhalb der Nukleinsäuren. Daher ist es möglich, Organismen anhand der für sie typischen Basenfolge ihrer Nukleinsäuresequenzen zu identifizieren.

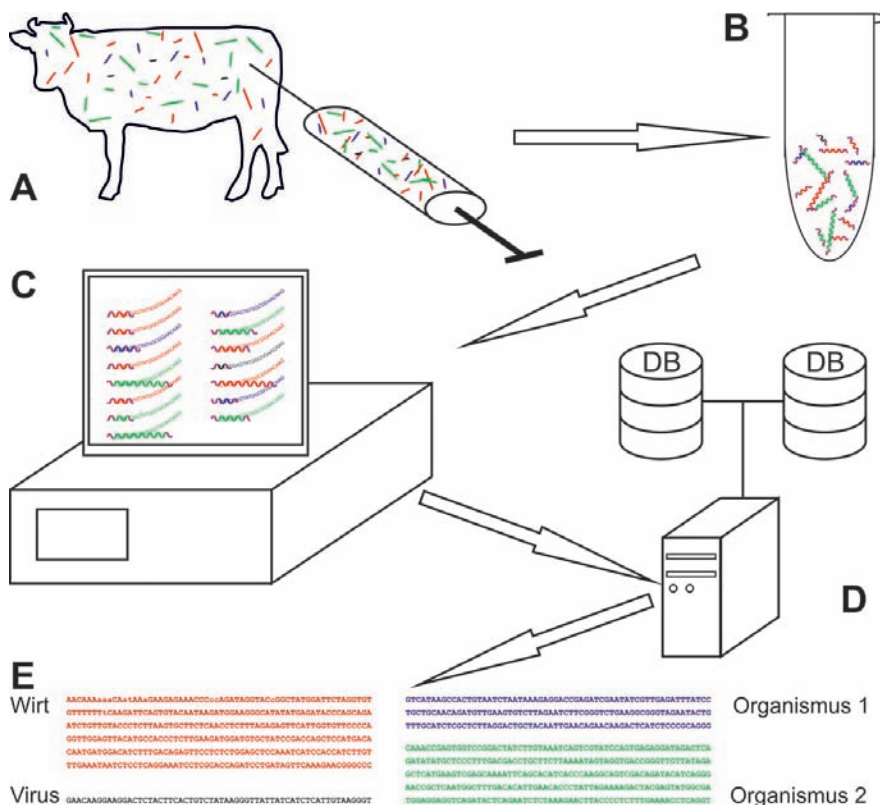


Abb. 1: Schematische Darstellung des Ablaufes einer Metagenomanalyse (Details im Text).

Die Metagenomanalyse wird seit 1998 eingesetzt und seitdem fortlaufend optimiert. Mit der so möglichen Sequenzierung der Gesamtheit der Nukleinsäuren in einer Probe ist diese Verfahrensweise nun auch als diagnostische Methode interessant. Das Ziel ist die Identifizierung eines durch gerichtete Verfahren wie real-time RT-PCR oder serologische Nachweismethoden nicht erkannten Erregers. Da bis auf Prionen alle Pathogene - unabhängig davon, ob es sich um Viren, Bakterien oder eukaryontische Organismen handelt - über ein Genom verfügen, können sie auf der Basis dieser Information identifiziert werden. Selbst kurze Bruchstücke des Genoms reichen dabei schon für eine erste taxonomische Zuordnung des Erregers aus. **Abbildung 1** zeigt schematisch die wichtigsten Schritte des Verfahrens. Zunächst wird eine möglichst repräsentative Probe der Nukleinsäuren von einem erkrankten Tier isoliert (A in **Abb. 1**) und daraus eine sogenannte DNA-Bibliothek für die Sequenzierung präpariert (B in **Abb. 1**). Diese DNA-Bibliothek enthält wiederum einen repräsentativen Ausschnitt aus der zuvor gewonnenen Probe. Die Sequenzierung (C in **Abb. 1**) ergibt für jedes Molekül der DNA-Bibliothek eine individuelle Basensequenz. Je

nach verwendeter Sequenzier-Plattform und gewünschtem Umfang erhält man mehrere 10000 bis einige Millionen DNA-Sequenzen. Diese werden zuletzt durch geeignete bioinformatische Verfahren den unterschiedlichen Organismen zugeordnet (D und E in **Abb. 1**).

Die oben geschilderte Vorgehensweise wurde erfolgreich zur Identifizierung des Schmallenberg-Virus eingesetzt, nachdem alle gerichteten Verfahren zum Nachweis eines zum Krankheitsbild passenden Erregers ein negatives Ergebnis lieferten [1]. Aus insgesamt rund 27 000 individuellen Sequenzen, welche die Sequenzierung des Probenpools der drei Milchkühe aus Schmallenberg ergab, konnten letztlich sechs mit großer Ähnlichkeit zu verschiedenen Vertretern der Orthobunyaviren herausgefiltert werden. Diese Sequenzen gaben damit den entscheidenden ersten Hinweis auf das Virus, das im Folgenden isoliert, angezüchtet und weiter vermehrt werden konnte. Zeitnah wurde auf Basis der ersten Sequenzinformationen eine real-time RT-PCR als Routineverfahren zur Erkennung von Infektionen mit dem neuen Virus entwickelt. Nach dem Herkunftsort der Proben erhielt das Virus den Namen Schmallenberg-Virus (SBV).

¹ Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems

² Friedrich-Loeffler-Institut, Seestraße 55, 16868 Wusterhausen

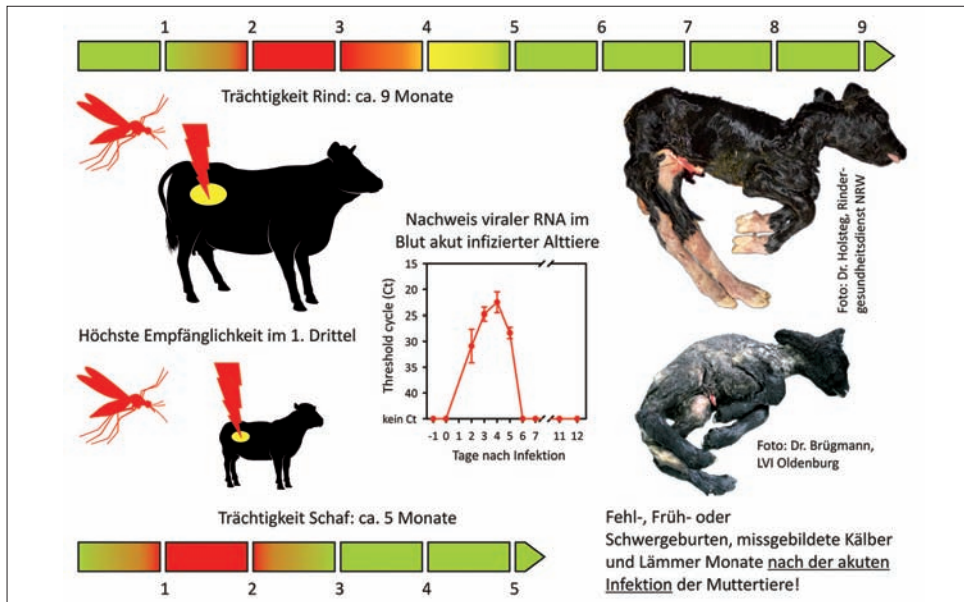


Abb. 2: Die Entstehung von Missbildungen bei Kälbern und Lämmern nach Infektion der Muttertiere mit dem Schmallenberg-Virus im zeitlichen Verlauf. Das Virus wird durch blutsaugende Insekten auf nicht immune Muttertiere übertragen, die bei Erstinfektion eine kurz andauernde Virämie, aber meist milde (Fieber/Milchrückgang) oder keine äußeren Krankheitsanzeichen entwickeln. Greift die Infektion auf den Fötus über, kommt es abhängig vom Trächtigkeitsstadium zu unterschiedlich stark ausgeprägten Missbildungen, die als „Arthrogrypose-Hydranenzephalie-Syndrom“ zusammengefasst werden. Wenn diese Missbildungen auffallen, liegt die Infektion der Muttertiere aber bereits mehrere Monate zurück.

Das Schmallenberg-Virus, ein Vertreter der Simbu-Serogruppe

Das Schmallenberg-Virus gehört zur Gattung der *Orthobunyaviren* (Familie *Bunyaviridae*). Diese Gattung umfasst zahlreiche von Insekten (blutsaugende Stechmücken und Gnitzen) übertragene Viren, die überwiegend Erkrankungen bei Wiederkäuern hervorrufen. Die weiteste Verbreitung finden Orthobunyaviren in Afrika, Asien und Ozeanien; in Europa traten bisher sehr selten Orthobunyaviren (z. B. Tahyna- und Batai-Virus) auf. Innerhalb der Gattung ist SBV am nächsten mit den Viren der Simbu-Serogruppe verwandt. Vertreter dieser Gruppe sind z. B. das Akabane-, Aino-, Sathuperi- und Shamonda-Virus. Die genannten Viren sind bisher aus Insektenvektoren und Wiederkäuern isoliert worden. Besonders das Akabane-Virus hat z. B. in Japan und Israel zu Ausbrüchen mit Missbildungen bei neugeborenen Kälbern geführt. Viren der Simbu-Serogruppe wurden vor dem Schmallenberg-Virus in Europa noch nie festgestellt.

Bisher ist das Wissen über die Auswirkungen einer Infektion mit dem Schmallenberg-Virus lückenhaft. Es kann aber angenommen werden, dass zahlreiche Gemeinsamkeiten mit anderen verwandten Simbuviren bestehen. Die meisten publizierten Informationen zu Infektionen mit Viren der Simbu-Serogruppe liegen bisher zum Akabane-Virus (AKAV) vor. Eine Infektion von adulten Hauswiederkäuern mit AKAV führt meist zu einer klinisch inapparenten Virämie, es wurden aber auch fieberhafte Erkrankungen und Enzephalomyelitiden beschrieben. Werden Rinder im ersten Monat der Trächtigkeit erstmals infiziert, findet bei AKAV meist keine Übertragung auf den Embryo statt. Eventuell kommt es aber zum Absterben des Embryos mit Frühabort oder Umrindern. In späteren Stadien der Gravidität kann das Virus den Fötus jedoch schwer schädigen. Im Fötus greift AKAV hauptsächlich das Gehirn, Rückenmark und die Skelettmuskulatur an. Durch Virusvermehrung in heranreifenden Neuronen und Myotubuli der fötalen Muskulatur

kommt es zum Zelluntergang und entzündlichen Prozessen in den umgebenden Geweben, die letztlich zu den beobachteten Missbildungen führen [2]. Neben Aborten und der Geburt mumifizierter Föten sind insbesondere Früh- oder Totgeburten sowie die Geburt lebensschwacher, missgebildeter Lämmer und Kälber möglich [3]. Auch nach einer Infektion trächtiger Tiere mit dem Aino-Virus sind Aborte und missgebildete Kälber aufgetreten [4,5].

Die durch die Viren der Simbu-Serogruppe induzierten Missbildungen werden unter dem Begriff „Arthrogrypose-Hydranenzephalie-Syndrom“ (AHS) zusammengefasst. Die Inzidenz und Ausprägung von AHS ist abhängig vom Zeitpunkt der Infektion. Werden Rinderföten vor der 16. Trächtigkeitswoche infiziert, führt dies meist zu Por- oder Hydranenzephalie (Lückenbildung in der Hirnsubstanz bis hin zum völligen Verlust des Großhirns unter Umbildung in eine flüssigkeitsgefüllte Blase). Bei Infektionen nach der 16. Trächtigkeitswoche kommt es hingegen überwiegend zur Entwicklung eines Tortikollis (fixierte Kopfstellung) und einer Arthrogrypose (Gelenkversteifung in Beugstellung; **Abb. 2**) [6], wobei der Anteil missgebildet geborener Kälber bei einer Infektion im letzten Drittel der Trächtigkeit sehr stark abnimmt. Bei einer Erstinfektion zwischen der 6. und 14. Woche der Trächtigkeit ist dieser am höchsten. Beim Schaf reicht die kritische Phase für eine AKAV-Infektion etwa von der 4. bis zur 6. Trächtigkeitswoche, wobei bei einer Infektion nach dem 42. Tag kaum noch Missbildungen auftreten [7, 8]. Über den Verlauf einer AKAV-Infektion bei trächtigen Ziegen ist bisher wenig bekannt, aber Missbildungen wurden ebenfalls beschrieben [9].

Über entsprechende Missbildungen, wie sie für Infektionen mit AKAV beschrieben wurden, insbesondere bei Lämmern, Kitzen und Kälbern mit typischem AHS, wurde seit Anfang Dezember aus Deutschland, den Niederlanden, Belgien, Frankreich, Großbritannien, Italien und Luxemburg und Spanien berichtet (s. DTBl. 3/2012

S. 348 sowie unten angegebene Links) und konnten auf Infektionen mit dem Schmallenberg-Virus zurückgeführt werden (**Tab. 1**). Die beobachteten Veränderungen können nicht von AKAV-induzierten Schädigungen differenziert werden. Der labor diagnostische Nachweis von SBV schafft in vielen Fällen Sicherheit bezüglich der Ätiologie. Es muss an dieser Stelle betont werden, dass weniger Aborte eine Rolle zu spielen scheinen, sondern in erster Linie Totgeburten und die Geburt typischer missgebildeter Lämmer und Kälber, die nicht lebensfähig sind. Die jetzt auftretenden Fälle sind Spätfolgen einer Infektion der trächtigen Muttertiere mit SBV während der letzten vektoraktiven Zeit im vergangenen Sommer und Herbst. Die aktuell festgestellten Fälle zeigen folglich kein aktives Infektionsgeschehen an. Während der kalten Jahreszeit ist mit keiner wesentlichen Vektoraktivität und somit auch nicht mit epidemiologisch relevanten Neuinfektionen zu rechnen. Jedoch wird die Vektoraktivität bei steigenden Temperaturen wieder zunehmen und kann zu neuen Infektionen führen.

Diagnostik

Der direkte Nachweis des Schmallenberg-Virus erfolgt in den meisten Fällen mittels real-time (RT-) PCR, in speziellen Fällen kann das Virus auch auf Insekten- und Hamsterzelllinien angezüchtet werden. Geeignete Probenmaterialien zum Nachweis akut infizierter adulter Tiere sind Serum oder EDTA-Blut. Erfolgversprechend ist aber nur die Untersuchung von Probenmaterial, das während der klinischen Phase (Fieber, Durchfall, Milchrückgang) entnommen wurde. Solche akuten Infektionen sind jedoch nur während der Vektorsaison zu erwarten (April bis November). Der Erregernachweis bei Aborten, Totgeburten und missgebildeten Lämmern bzw. Kälbern erfolgt zunächst aus dem Gehirn. Als ergänzendes Probenmaterial kommen insbesondere Herzblut, Milz, Fruchtwasser und Mekonium in Frage. Allerdings ist selbst bei typischen Missbildungen mitunter kein Virus

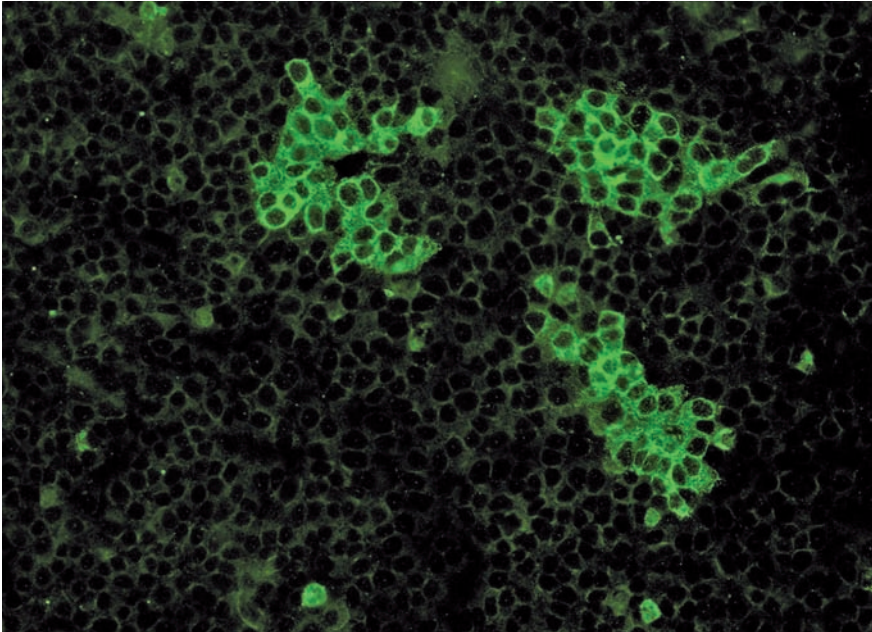


Abb. 3: Immunfluoreszenzaufnahme von Schmallenberg-Virus in Vero-Zellkulturen. Virusinfizierte Zellkulturen dienen als Antigenmatrix in einem indirekten Immunfluoreszenztest für die Untersuchung von Rinder- und Schafseren auf Antikörper. Im positiven Fall wird die Bindung der Antikörper an das Virus mit einem fluoreszenzmarkierten Konjugat visualisiert.

mehr nachweisbar, was auch für das nah verwandte AKAV beschrieben wurde. In diesen Fällen kann durch den Nachweis SBV-spezifischer Antikörper im Fötus die Ätiologie abgeklärt werden. Bei Totgeburten ist hier Herzblut als Probenmaterial geeignet. Werden verdächtige Tiere lebend geboren, sollten Serumproben unbedingt vor der Kolostrumaufnahme genommen werden, weil sonst der Antikörpernachweis nur

eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt. Positive Antikörpernachweise bei Muttertieren und bei Neugeborenen nach Kolostrumaufnahme lassen nur eingeschränkt Rückschlüsse zu, da eine Infektion auch schon vor oder nach der kritischen Phase der Trächtigkeit stattgefunden haben kann. Im Zusammenhang mit dem sehr typischen Bild des AHS kann jedoch SBV als mögliche Ursache angenommen werden.

Der Antikörpernachweis erfolgt gegenwärtig mittels indirekter Immunfluoreszenz (Abb. 3) oder im Neutralisationstest; ELISA-Verfahren befinden sich in der Entwicklung und Validierung. Probenmaterial der Wahl für den Antikörpernachweis ist derzeit Serum, da nur mit diesem Material eine Überprüfung im Neutralisationstest möglich ist.

Eine Infektion mit SBV kann weitgehend ausgeschlossen werden, wenn das Muttertier serologisch negativ ist oder im Kalb oder Lamm weder das Virus noch spezifische Antikörper nachgewiesen werden können.

Für den Menschen ist SBV nach allen bisherigen Erkenntnissen nicht gefährlich. Es gibt weder für die nahe verwandten Viren der Simbu-Serogruppe noch für SBV Hinweise auf ein zoonotisches Potenzial.

Epidemiologie der Infektion in Deutschland

Die gemeldeten SBV-Ausbrüche betrafen bisher überwiegend Schafe haltende Betriebe (über 80 Prozent der Fälle), gefolgt von Rinder- und Ziegenhaltungen. Ein einzelner Fall wurde bei einem Bison nachgewiesen. Derzeit steigt der Anteil der Fälle bei Kälbern, während sich seit der 2. Februarhälfte ein Rückgang bei Schafen andeutet. Innerhalb Deutschlands bestehen

deutliche Unterschiede in der räumlichen Verteilung der Ausbrüche. Obwohl inzwischen alle Bundesländer betroffen sind, scheint das Gebiet mit der höchsten Dichte an Ausbrüchen in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen, Hessen und Schleswig-Holstein zu liegen. Insgesamt sind ein West-Ost- und ein Nord-Süd-Gefälle hinsichtlich der Dichte der Ausbrüche zu erkennen (Abb. 4).

Bisher vorliegende Zahlen zur Seroprävalenz korrelieren erwartungsgemäß mit der räumlichen Verteilung der Virusnachweise. In Beständen aus dem Kerngebiet serokonvertierten bis zu 80 Prozent der Tiere, während die Zahlen mit dem Ausbruchsgefälle abnehmen und zwar sowohl in Bezug auf die betroffenen Bestände als auch auf die Bundesländer.

Erste epidemiologische Analysen zeigen, dass die Dichte der Ausbrüche in Schafhaltungen mit der Populationsdichte bei Schafen korreliert ist. Aus der Trächtigkeitdauer von im Mittel 150 Tagen und einem wahrscheinlichen Zeitraum für die diaplastare Infektion zwischen der 4. und 6. Woche der Trächtigkeit lässt sich der wahrscheinliche Infektionszeitraum für die Schafe berechnen. Es ergibt sich, dass die Infektion der missgebildet geborenen Lämmer im Wesentlichen zwischen der 37. und 42. Kalenderwoche des Jahres 2011 (ca. Mitte September bis zweite Oktoberhälfte) stattgefunden haben müsste. In dem gleichen Zeitraum lag in den Jahren 2006 und 2007 jeweils das Maximum der Neuerkrankungen an Blauzungenkrankheit (Serotyp 8) und das Maximum der mit dem Virus der Blauzungenkrankheit infizierten Gnitzen. Die vorliegenden epidemiologischen Daten stehen folglich im Einklang mit der Hypothese, dass belebte Vektoren bei der Übertragung von SBV eine wesentliche Rolle spielen.

Übertragungsweg, natürliche Immunität und Immunprophylaxe

Eine direkte Übertragung der SBV-Infektion von Tier zu Tier scheint nicht möglich zu sein.

Das verfügbare Wissen über Orthobunyaviren, epidemiologische Daten und die bisherigen Tierexperimente sprechen für eine Übertragung von SBV durch Insekten. Unterstützt wird diese Annahme durch erste Nachweise von Erreger-RNA in Gnitzen (*Culicoides* spp.) in Belgien und Dänemark. Dadurch kommt es zu einem saisonalen Auftreten der akuten Infektionen. Auch am FLI laufen Untersuchungen von im Herbst 2011 gefangenen Gnitzen, um die verantwortliche Vektorengruppe weiter einzuzengen.

Erste Ergebnisse aus einem Tierversuch mit Kälbern sowie die verfügbaren Daten zu AKAV sprechen zudem dafür, dass Tiere, die eine akute Infektion durchlaufen haben, eine natürliche Immunität aufbauen. Diese Immunität schützt vermutlich vor einer erneuten Infektion mit SBV. Wie lange dieser Schutz anhält ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Man kann aber davon ausgehen, dass SBV-infizierte Tiere, ähnlich wie bei AKAV, eine über mehrere

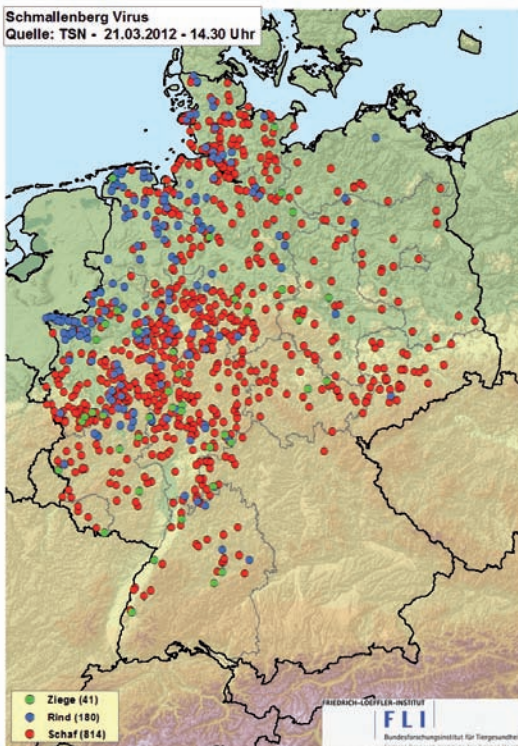


Abb. 4: Karte zur Verbreitung des Schmallenberg-Virus in Deutschland (Stand 21. März 2012)

Monate, wenn nicht Jahre, anhaltende Immunität ausbilden.

Gegen AKAV werden in den betroffenen Ländern, z. B. Japan, sowohl attenuierte als auch inaktivierte Impfstoffe eingesetzt. Aufgrund der geringen Homologie zwischen SBV und AKAV ist jedoch kaum zu erwarten, dass die Impfung gegen AKAV gegen SBV schützen würde. Daher sind für eine Immunprophylaxe SBV-spezifische Impfstoffe notwendig. Ein inaktivierter Impfstoff ist dabei die erste Wahl und entsprechende Entwicklungen sind auch am FLI angelaufen.

Ausblick

Seit der ersten Feststellung des Schmallenberg-Virus vor rund fünf Monaten konnten zwar schon wesentliche Erkenntnisse zum Virus und der Infektion gewonnen werden sowie eine erste Diagnostik (real-time RT-PCR als Schnellnachweis, erste Antikörpertests) etabliert werden, es gibt jedoch noch zahlreiche offene Fragen. Die genaue Verbreitung und die in Europa verantwortlichen Vektoren sind ebenso wenig bekannt wie die Herkunft des Virus. Zu diesen Fragen laufen Untersuchungen, an denen das FLI beteiligt ist.

Ob und wie sich das Virus in der Vektorsaison 2012 ausbreiten wird und welche Folgen daraus gegebenenfalls entstehen, kann im Moment noch nicht abgeschätzt werden.

Nach der Blauzungenkrankheit ist es mit SBV zum zweiten Mal zum Eintrag einer vektorübertragenen Tierseuche nach Mitteleuropa gekommen. Anscheinend existiert ein Eintragungsweg, den es zu identifizieren und möglichst zu schließen gilt.

Danksagung

Die Autoren danken Kathrin Teske und Doris Kämer, Institut für Epidemiologie des FLI, für die Erstellung des Kartenmaterials.

Tab. 1: Bestätigte Fälle – Schmallenberg-Virus (21. März 2012 – 14.30 Uhr)

Land	Bestätigte Fälle				Stand
	Rind	Schaf	Ziegen	Gesamt	
Frankreich	53	761	10	824	16.3.2012
Belgien	96	157	2	255	19.3.2012
Niederlande	84	103	5	192	20.3.2012
Luxemburg	1	6		7	7.3.2012
Großbritannien	14	176		190	20.3.2012
Italien			1	1	20.2.2012
Spanien		1		1	13.3.2012
Deutschland	180	814	41	1035	21.3.2012
Gesamt	428	2018	59	2505	

Quelle: TSN

Weiterführende Informationen im Internet

- **FLI:** www.fli.bund.de
- **Risikobewertung des European Center for Disease Prevention and Control:** http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=795
- **EU-Kommission:** http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/schmallenberg_virus/
- **OIE:** www.oie.int/en/our-scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/schmallenberg-virus/
- **Niederlande:** www.vwa.nl/onderwerpen/dierziekten/dossier/schmallenbergvirus
- **Belgien:** www.favv-afscab.be/santeanimale/schmallenberg/
- **Frankreich:** www.survepi.org/cerepi/
- **Großbritannien:** www.defra.gov.uk/animal-diseases/a-z/schmallenberg-virus/
- **Italien:** www.izs.it/IZS/Engine/RAServePG.php/P/357410010300/M/250010010303
- **Luxemburg:** www.ma.public.lu/actualites/communiqués/2012/01/20120124_02/index.html

Korrespondierender Autor: Dr. Martin Beer, Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems

Literatur

- [1] Hoffmann, B. et al. (2012): *Emerg Infect Dis*, 18(3): 469-472.
- [2] Edwards, JF. et al. (1989): *Vet Pathol*, 26(1): 33-39.
- [3] Konno, S.; Moriwaki, M.; Nakagawa, M. (1982): *Vet Pathol*, 19(3): 246-266.
- [4] Uchinuno, Y. et al. (1998): *J Vet Med Sci*, 60(10): 1139-1140.
- [5] Noda, Y. et al. (1998): *Vet Pathol*, 35(5): 409-411.
- [6] Kirkland, PD. et al. (1988): *Vet Rec*, 122(24): 582-586.
- [7] Parsonson, IM. et al. (1988): *J Comp Pathol*, 99(2): 215-227.
- [8] Hashiguchi, Y.; Nanba, K.; Kumagai, T. (1979): *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 19(1-2): 1-11.
- [9] Kurogi, H. et al. (1977): *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 17(1): 1-9.

Anzeige

Anzeige