

DVG-Konsiliarlabor für PRRS-Virus

Vom Lelystad-Virus zur Vollgenomsequenzierung

Valerij Akimkin, Lisa Schneider-Bühl, Ekkehard Hiller, Birgitta Polley

Das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart erhielt am 01.07.2017 von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) die Ernennung zum Konsiliarlabor für das Porzine-reproduktive- und-respiratorische-Syndrom-(PRRS-)Virus. In enger Kooperation mit dem im Haus ansässigen Schweinegesundheitsdienst Stuttgart der Tierseuchenkasse Baden-Württemberg arbeiten die Bereiche Pathologie, Virologie, Serologie und Molekularbiologie an der stetigen Weiterentwicklung der PRRS-Diagnostik und der molekularen Epidemiologie. Ein Schwerpunkt dabei sind Sequenzierungen des Erregergenoms und der Aufbau einer PRRSV-Sequenzdatenbank.

und Amerika getrennt voneinander und wurde bald darauf als EU-Virus (PRRSV Typ 1) und US-Virus (PRRSV Typ 2) bezeichnet. Anhand des klinischen Bildes lassen sich die Viren jedoch kaum unterscheiden. PRRS verbreitete sich sehr schnell in der ganzen Welt und ist mittlerweile zu einer der wichtigsten viralen Infektionskrankheiten bei Schweinen geworden. Von 1991 bis 1993 war PRRS in Deutschland eine anzeigepflichtige Tierseuche und ist bis heute eine von der Welt-Tiergesundheitsorganisation (OIE) gelistete Infektion.

Wie der Name der Erkrankung schon andeutet, ist der Verlauf der Infektion bei Zuchtsauen durch reproduktive Störungen wie Aborte, mumi-fizierte, frühgeborene und lebensschwache Ferkel gekennzeichnet (Abb. 2). Bei Jungtieren und

Die wirtschaftlichen Verluste durch PRRS können immense Ausmaße annehmen. Allein in Baden-Württemberg wurden die Kosten auf bis zu 135000,00 € pro Betrieb und Ausbruch geschätzt. Die Bekämpfung des Virus ist auch 33 Jahre nach seinem ersten Auftreten noch schwierig. Neben strikten Biosicherheitsmaßnahmen, hohen Hygienestandards und optimalem Herdenmanagement sind hierbei Impfung, Diagnostik und Monitoring essenziell.

Das Virus

Das PRRS-Virus wird der Ordnung der Nidovirales, der Familie der Arteriviridae und der Gattung *Betaarterivirus* zugeordnet. Die beiden Sub-

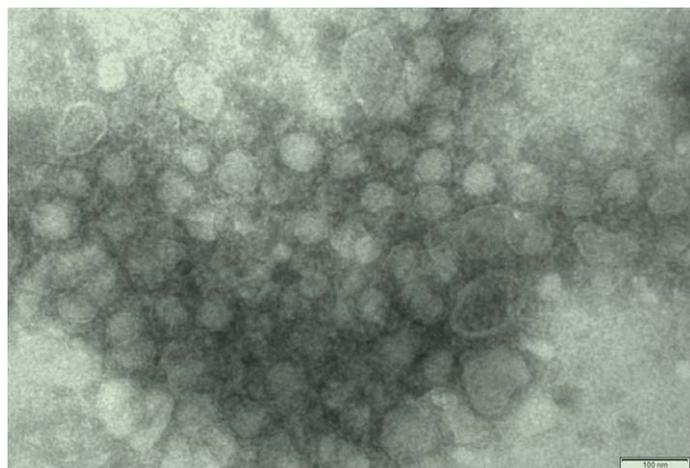


Abb. 1: PRRSV-Partikel im Transmissionselektronenmikroskop.



Abb. 2: Abort infolge einer PRRSV-Infektion.

PRRS – die wirtschaftlich bedeutendste Erkrankung der Schweine

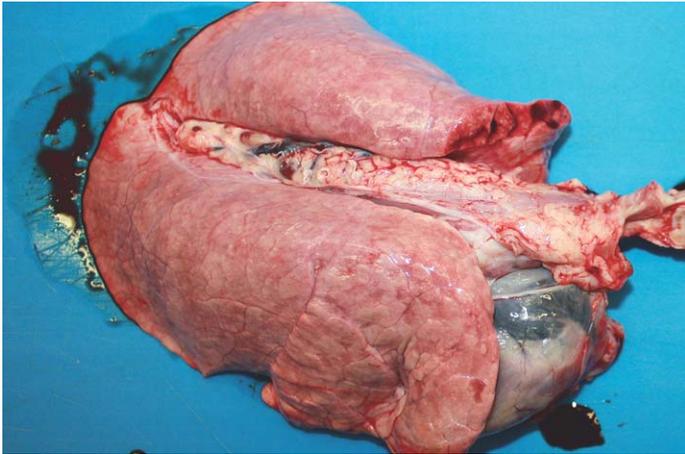
Als im Jahre 1987 eine bis dahin unbekannte Tierseuche unter dem Namen „Mystery Swine Disease“ weltweit zu massiven wirtschaftlichen Verlusten in der Schweineproduktion führte, begann eine fieberhafte Suche nach dem Erreger, der mit der aufsehenerregenden Publikation von Wensvoort et al. (1991)¹ zunächst als das „Lelystad-Virus“ bezeichnet wurde. Wegen der unterschiedlichen Symptome, die das Virus verursachte, war die Zahl der Bezeichnungen anfangs vielfältig: Blue Ear Disease, Seuchenhafter Spätabort der Schweine (SSS) und zunehmend die heute gebräuchliche Bezeichnung Porzine reproduktives und respiratorisches Syndrom. Das so bezeichnete Virus PRRSV (Abb. 1) entwickelte sich in Europa

Mastschweinen können die Krankheitssymptome sehr variabel ausfallen. In den betroffenen Beständen steigen die Ferkelverluste, man beobachtet gehäuft Kümmerer und das Auseinanderwachsen der Tiere. Zum Krankheitsbild gehören oft Husten, Fieber, Zyanose, Konjunktivitis und Lungenentzündung (Abb. 3). Auch die Ausprägung und der Schweregrad der klinischen Symptome sind dabei extrem unterschiedlich. Während viele Infektionen symptomlos oder nur sehr mild verlaufen (Husten, Konjunktivitis), können auch seuchenhafte Aborte und schwere Verläufe mit hoher Morbidität und Mortalität beobachtet werden. Im Jahr 2006 infizierten neue sog. highly-pathogenic PRRS-Virus-Stämme (HP-PRRSV) in Asien binnen 6 Monaten über 2 Millionen Schweine mit mehr als 400000 Todesfällen.

genera *Eurpobarterivirus* mit der Spezies *Betaarterivirus* suid 1 (PRRSV-1, ursprünglich aus Europa) und *Ampobarterivirus* mit der Spezies *Betaarterivirus* suid 2 (PRRSV-2, ursprünglich aus Nordamerika) stimmen in ihren Genomen nur zu ca. 60 Prozent überein. Die runden, behüllten Viruspartikel sind 45–60 nm groß (Abb. 1). Das einzelsträngige, lineare RNA-Genom ist ca. 15 kbp lang und besteht aus zehn Open Reading Frames (ORF), die für 21 Proteine kodieren. Drei dieser Genabschnitte, ORF5, ORF6 und ORF7, sind für die Diagnostik von besonderer Bedeutung. ORF5 kodiert für das Hüllprotein GP5 und ist hochvariabel. Molekularbiologische Analysen dieses Genbereichs dienen der phylogenetischen Charakterisierung des Virus. Die Abschnitte ORF6 und ORF7 kodieren für das

¹ Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong MF, van 't Veld P, Greenland GJR, van Gennep JA, Voets MTH, Verheijden JHM, Braamskamp J (1991): Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly*, 13 (3): 121–130.

² Die Norm ISO/IEC 17025 ist der weltweit gültige Standard für die Akkreditierung von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (s. www.dakks.de)



© Dr. Schwabe/CVUA Stuttgart

Abb. 3: Interstitielle Pneumonie bei einer PRRS-Infektion.

Matrix- respektive Nukleokapsidprotein. Sie sind im Gegensatz zu ORF5 eher konserviert und eignen sich dadurch gut als Zieltarget für den diagnostischen Nachweis mittels PCR (polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion).

Eine insbesondere für die Praxis bedeutende Eigenschaft der PRRS-Viren ist ihre ungewöhnlich hohe Mutationsrate, die deutlich höher ist als bei anderen Viren. Aufgrund einer viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase ohne Korrekturfunktion kommt es alle 100 bis 1000 Nukleotide zu einem Fehler bei der RNA-Transkription, was zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Virusvarianten, sog. Quasispezies führt. Neben diesen zufälligen Mutationen kommt es bei PRRSV auch häufig zu Rekombinationen. Hierbei wird genetisches Material zwischen zwei oder mehreren Virusstämmen ausgetauscht. Dies kann zu einer plötzlichen, starken Veränderung der phäno- und genotypischen Eigenschaften des Virus führen, die sich z. B. in einer erhöhten Virulenz zeigen. Dies wird als Ursache für die Entstehung der HP-Stämme gesehen.

Auch die zur Bekämpfung des PRRS eingesetzten modifizierten Lebendvaccine (MLV) spielen bei der Entstehung von rekombinanten Stämmen eine große Rolle. Da die Impfstämme in der Lage sind, eigenständig in den Zellen zu replizieren und auch in den Beständen zu zirkulieren, kann es leicht zu Rekombinationen zwischen Feld- und Impfviren, aber auch zwischen verschiedenen Impfviren kommen. Werden zur genetischen Charakterisierung solcher rekombinanter Isolate nur kurze Genabschnitte verwendet, so kann dies insbesondere dann zu einer falschen Einschätzung der epidemiologischen Situation im Bestand führen, wenn die Rekombination ausgerechnet im untersuchten Genomabschnitt stattfand.

Das Konsiliarlabor

Mit dem Nachweis von PRRSV beschäftigt sich das CVUA Stuttgart bereits seit über 25 Jahren intensiv. Nachdem wir die Serologie von 1992 bis 1996 mittels Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) sowie den Virusnachweis mittels Virus-

züchtung in primären Lungenmakrophagen etabliert und durchgeführt hatten, wurde im Jahr 1995 der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) als serologische Methode eingeführt.

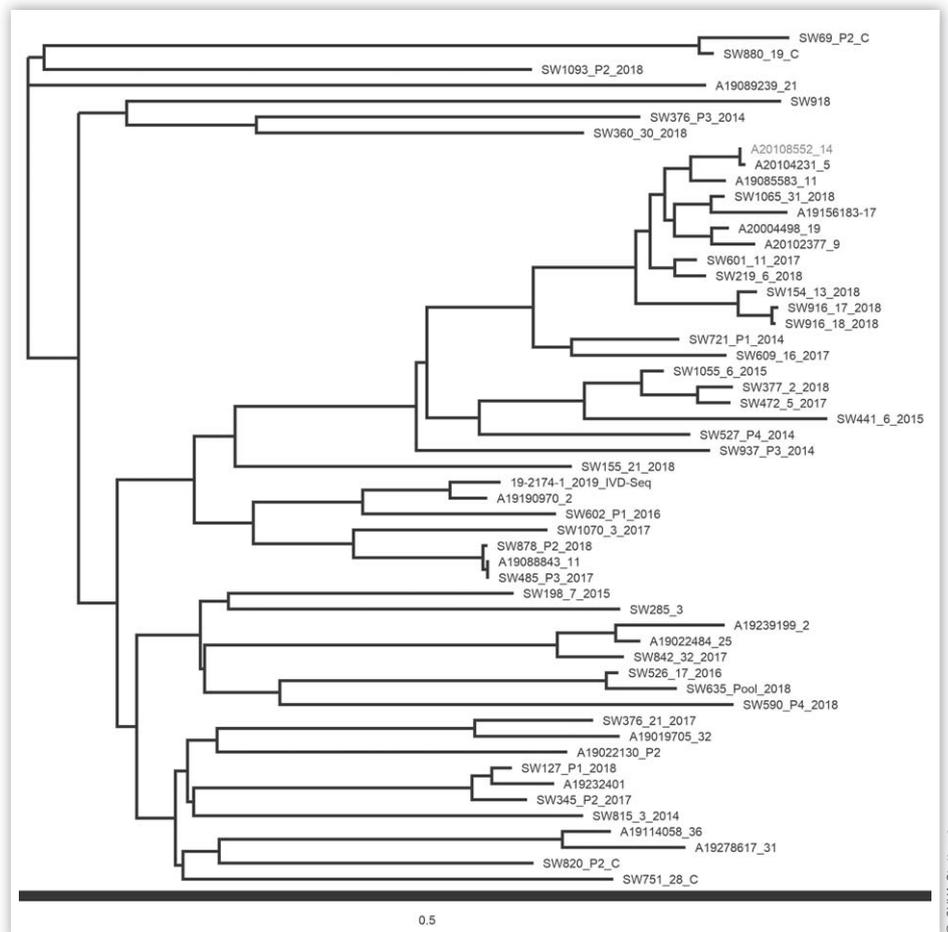
Mittlerweile erfolgt der Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper am CVUA Stuttgart in der Regel nur noch mittels ELISA aus Serum oder Speichel (oral

fluid, Probengewinnung über Kaustricke). Diese weit verbreitete Methode eignet sich v. a. für Screening-Tests. Zahlreiche kommerzielle ELISA-Testkits von unterschiedlichen Herstellern stehen zur Verfügung, wobei Sensitivität und Spezifität z. T. erheblich variieren können. Eine sichere Unterscheidung in Antikörper gegen PRRSV-1 und PRRSV-2 ist in der Regel genauso wenig möglich wie eine Unterscheidung zwischen Feld-, Impf- oder maternalen Antikörpern. Auch kann durch eine einfache serologische Untersuchung kein Rückschluss auf die Immunität der Tiere gezogen werden, da nicht alle Antikörper (kreuz)protektiv sind.

Weiterhin stehen für den Antikörpernachweis zellkulturbasierte serologische Verfahren zur Verfügung, dazu gehören Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA), Immunofluorescence Assay (IFA) sowie Serumneutralisationstest (SNT). Die Durchführung dieser Methoden ist allerdings sehr zeit- und personalaufwendig und nicht für große Probenmengen geeignet.

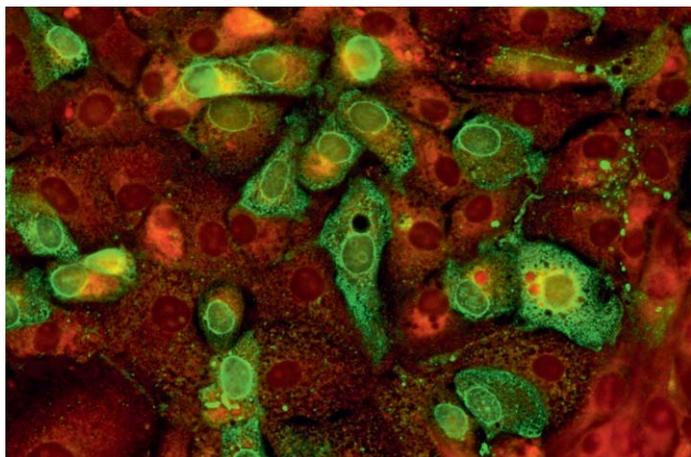
Der direkte Nachweis des PRRSV erfolgte im CVUA Stuttgart seit 2001 zunächst mittels konventioneller PCR. In der Folgezeit etablierten und testeten wir verschiedene publizierte RT-qPCR-Verfahren und entwickelten 2005 auch selbst eine sensitive Real-Time-PCR-Methode unter Verwendung sogenannter LUX®-Primer (nicht publiziert). Die Untersuchung mittels RT-qPCR dauert nur wenige Stunden, ist für Massenproben geeignet, quantifizierbar und in der Lage, je nach Protokoll zwischen PRRSV-1, PRRSV-2 und auch PRRS-HP zu unterscheiden. 2012 testeten wir verschiedene Aufreinigungsmethoden zur Gewinnung von Virus-RNA sowie kommerzielle PCR-Kits zum Nachweis von PRRSV und veröffentlichten die Ergebnisse 2012 auf unserer Homepage sowie 2013 im *Vetjournal* unter dem Titel „Sieben Schritte zu einer erfolgreichen PRRS-Diagnostik“.

Da die PCR-Verfahren auf der Passgenauigkeit der Primer an die Zielsequenz beruhen, stellt die hohe Mutationsrate der PRRS-Viren eine Herausforderung für den zuverlässigen Nachweis dar. Die hohe genetische Variabilität der



© CVUA Stuttgart

Abb. 4: Phylogenetische Analyse von ausgewählten PRRSV-Stämmen mit regionalem Zusammenhang zur Darstellung ihres genetischen Verwandtschaftsverhältnisses.



© Valerij Akimkin/CVUA Stuttgart

Abb. 5: PRRSV-positive Zellkultur im Fluoreszenzmikroskop.

Feldstämme sowie eine breite Verwendung von unterschiedlichen Lebendvakzinen und die ständige Möglichkeit von Rekombinationen bereiten einige Schwierigkeiten bei der vollständigen Aufklärung des Infektionsgeschehens im betroffenen Bestand. Starke Variationen im Zieltarget führen somit zu einem Versagen der PCR und damit zu einem falsch-negativen Ergebnis. Dies fordert von der Diagnostik ständige Kontrolle und Überarbeitung der Primer. Aus diesem Grund werden in unserem Labor immer wieder unterschiedliche Aufreinigungsmethoden und PCR-Testkits validiert und oft auch parallel für die Untersuchung von Routineproben eingesetzt.

Wurde PRRSV in einem Bestand nachgewiesen, wird eine anschließende Sequenzierung für eine molekularbiologische Charakterisierung des Stamms dringend empfohlen und auch immer häufiger angefordert. Seit 2012 bieten wir diese zusätzliche Diagnostik an, wobei in der Regel der variable ORF5-Bereich des Virus durch ein Partnerlabor mittels der Methode nach Sanger sequenziert wird. Die vorbereitende PCR wird in unserem Labor durchgeführt und ist seit 2015 als AVID-Methodenkandidat auf der Homepage des Arbeitskreises Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik veröffentlicht (AVID-Methodenkandidat VIR05: Genomnachweis des PRRSV mittels konventioneller RT-PCR zum Zwecke der Sequenzierung und phylogenetischen Auswertung). Durch den Abgleich der Sequenzen in der CVUA-S-Sequenzdatenbank, die dank eines Kooperationsprojekts mit dem Schweinegesundheitsdienst auf mittlerweile über 600 Isolate angewachsen ist, lassen sich oft epidemiologische Zusammenhänge, wie eine mögliche Herkunft des Virus, Beziehungen zwischen Beständen und potenziellen Eintragungsmöglichkeiten, klären (Abb. 4). Auch die Unterscheidung zwischen Impf- oder Feldstämmen ist möglich und wichtig, da es aufgrund einer Vielzahl von Faktoren immer wieder zu Impfdurchbrüchen kommt.

Die Erkenntnisse aus 5 Jahren Sequenzierungstätigkeit wurden 2017 unter dem Titel „Molecular epidemiology as an effective tool for the diagnosis and control of PRRSV infections

in pig farms, illustrated using five cases“ in der *Berliner Münchner Tierärztlichen Wochenschrift* publiziert.

Weitere direkte Erregernachweise, wie eine Virusanzucht in der Zellkultur, sind wenig praktikabel und werden in Routine-Laboratorien nur selten durchgeführt, da sie sehr zeit- und arbeitsintensiv sind. Zudem lässt sich insbe-

sondere PRRSV-1 nur in primären Lungenmakrophagen anzüchten, deren Gewinnung sehr aufwendig ist. Auch wenn die Anzucht des PRRSV-2 auf der permanenten Zelllinie MARC-145 gelingt (Abb. 5), wird sie nur in besonderen Ausnahmefällen in speziellen Laboratorien durchgeführt.

Status quo und Ausblick

Im CVUA Stuttgart werden jährlich ca. 3000 PCR- und 2000 Antikörperuntersuchungen auf PRRSV routinemäßig durchgeführt. Die hohe Anzahl an Feldproben zur PRRS-Diagnostik ermöglichte es uns, über die Jahre hinweg eine sehr große Sammlung an gut charakterisiertem PRRSV-positivem Material aufzubauen. Wir testen regelmäßig definierte Proben mit den verfügbaren Testsystemen und sind dabei auch in engem Kontakt mit den Herstellern. So sichern wir eine gleichbleibende Qualität der kommerziellen Diagnostika und können gezielt auf Probleme hinweisen. Unsere Materialsammlung stellen wir auf Anfrage auch gerne Laboren oder Kitherstellern zur Testetablierung oder -verifizierung zur Verfügung, soweit es unsere Möglichkeiten zulassen.

Als nach DIN EN ISO/IEC17025² akkreditiertes Labor nehmen wir an vielen Ringversuchen teil. Um auch unter den Laboratorien ein vergleichbares und hohes Niveau bei der PRRS-Diagnostik zu gewährleisten, richtet das Konsiliarlabor unter der Leitung von Dr. Valerij Akimkin und Dr. Ekkehard Hiller auch selbst regelmäßig Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) zum direkten und indirekten (serologischen) Erregernachweis aus. Unsere im Jahr 2017 durchgeführte LVU mit neun Teilnehmern aus sechs Bundesländern stieß auf großes Interesse. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die in den Laboratorien etablierten Nachweisverfahren in den meisten Fällen eine verlässliche PRRSV-Diagnostik ermöglichen. Dennoch mussten wir feststellen, dass die Verwendung älterer PCR-Protokolle vereinzelt zu falsch-negativen Ergebnissen beim Nachweis von in Deutschland aktuell kursierenden Virusstämmen führen kann. Die nächste Laborvergleichsuntersuchung ist für den Herbst 2020 geplant.

Mit Beginn des Jahres 2018 haben wir ein Projekt zur Nutzung von Next Generation Sequencing (NGS) für unsere Virusanalysen gestartet. Ein Ziel dieses Projekts ist es, zukünftig nicht nur einzelne Abschnitte, sondern das gesamte PRRSV-Genom aus Serum- und Gewebeproben zu sequenzieren und so eine Vollgenomsequenz-Datenbank aufbauen zu können. Dies soll z. B. das Erkennen von Rekombinationen und epidemiologischen Zusammenhängen in größerer Tiefe ermöglichen, als es durch Sanger-Sequenzierung nur einzelner ORF der Fall ist. Bis Frühjahr 2020 wurden bereits rund 50 Sequenzierungen durchgeführt. Trotz deutlicher Verbesserung in den letzten Jahren ist das NGS-Verfahren jedoch im Vergleich zu konventionellen Methoden nach wie vor kostenintensiv und stellt hohe Anforderungen an die Probenvorbereitung und Datenanalyse.

Fachliche Beratung

Wir stehen in sehr engem Kontakt mit den Tierärzten des Schweinegesundheitsdienstes Baden-Württemberg sowie mit praktizierenden Tierärzten und beraten gerne bei der Wahl der optimalen Untersuchungsmethode, bei der Ergebnisinterpretation und bezüglich möglicher epidemiologischer Zusammenhänge, Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten.

Gerne stellen wir den Kolleginnen und Kollegen in der Praxis, in Laboren und der Industrie bei schwierigen Fragestellungen unsere Expertise und unsere vielfältigen diagnostischen Methoden zur Verfügung. Bei Fragen wenden Sie sich gerne an uns.

Danksagung

Für ihre ausgezeichnete Arbeit bei der Umsetzung der serologischen und molekularbiologischen Versuche und Validierungen danken wir Silke Weidle, Jasmin Stelzer und Julia Skrypski herzlich. Besonderer Dank geht auch an Juliane Rieger für ihren hervorragenden Beitrag beim Erstellen dieses Manuskripts.

Korrespondierende Autoren



Dr. Valerij Akimkin
Fachtierarzt für Mikrobiologie, Tel. +49 711 3426-1740,
Valerij.Akimkin@cvuas.bwl.de



Dr. Lisa Schneider-Bühl
Fachtierärztin für Mikrobiologie, Tel. +49 711 3426-1660, Lisa.Schneider-Buehl@cvuas.bwl.de