

„Kaninchen-Ebola“ – Übertreibung oder Realität?

DVG-Konsiliarlabor für Rabbit Haemorrhagic Disease Virus

Patricia König, Kerstin Wernike, Maria Justiniano-Suarez

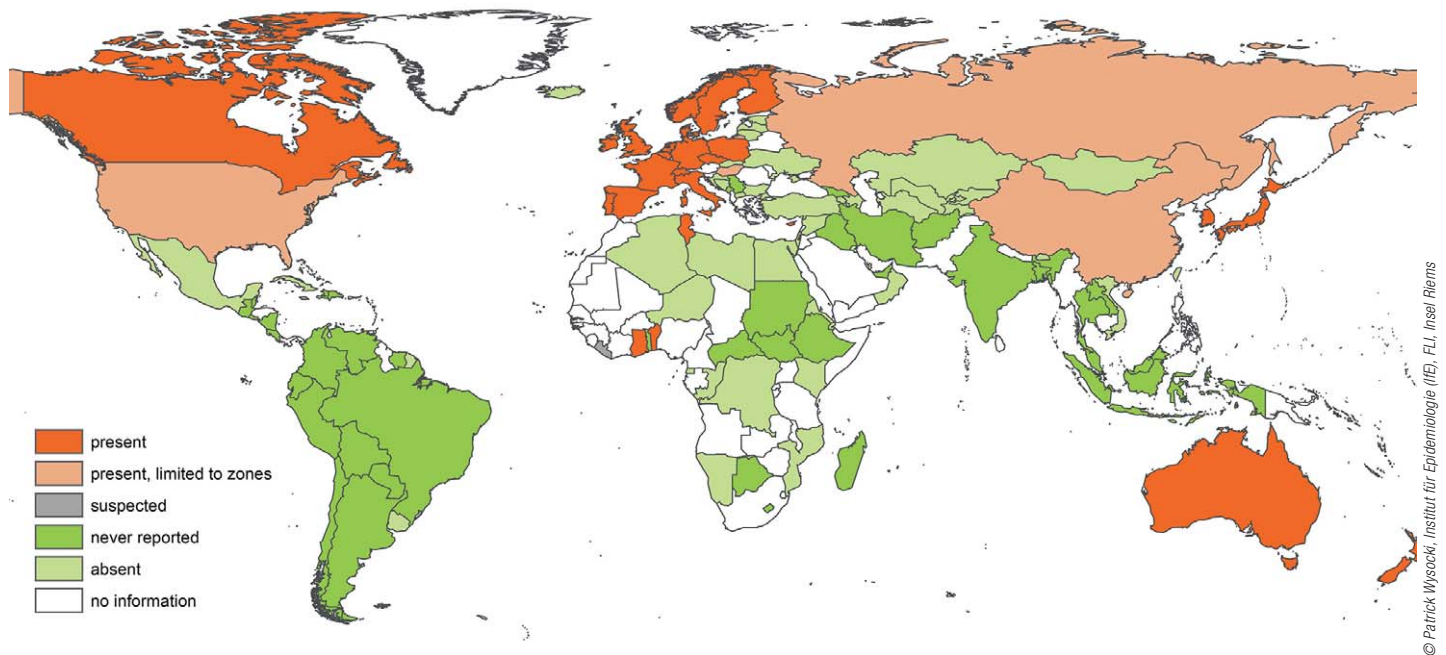


Abb. 1: Weltweiter „RHD disease status“ im Zeitraum vom 01.01. bis 31.12.2019 (Quelle: Wahis OIE)

Das Rabbit-Haemorrhagic-Disease-Virus (RHDV-)Labor am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) erhielt am 01.07.2017 von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) die Ernennung zum Konsiliarlabor, das sich hier kurz vorstellt.

Die hämorrhagische Krankheit der Kaninchen, Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD), ist seit den 1980er-Jahren bekannt und wird durch ein Calicivirus verursacht. Das RHD-Virus (RHDV) ist ein kleines unbehülltes RNA-Virus ohne zoonotisches Potenzial.

2010 ist in Europa RHDV2 aufgetreten, eine bisher unbekannte Variante des Erregers [1]. Der Erstnachweis in Deutschland erfolgte 2013. Bis 2016 verbreitete sich der neue Genotyp in ganz Deutschland und hat aktuell die klassische RHD des Genotyps 1 weitgehend verdrängt. Beide Genotypen sind mittlerweile weltweit verbreitet (Abb. 1).

Infizierte Tiere scheiden RHDV in extrem hohen Mengen in Sekreten, Kot, Urin und Blut aus. Die Viren werden in erster Linie durch direkten Kontakt übertragen, eine Ansteckung kann aber auch effizient über kontaminierte Gegenstände erfolgen (Bekleidung, Schuhwerk, Geräte, Käfige).

In der Wildtierpopulation (Wildkaninchen und Feldhasen) ist ein Virusreservoir vorhanden, von dem aus die Viren über direkten Kontakt sowie indirekt über Vektoren in Hauskaninchenhaltungen eingetragen werden können. Eine wichtige Rolle spielt vor allem Grünfutter, das mit Ausscheidungen infizierter Wildkaninchen verunreinigt ist. Große Bedeutung kommt ebenfalls Tierzukaufen und passiver Übertragung durch Insekten, v. a. Stechmücken und Fliegen, aber auch Raubvögeln und Nagern zu.

Zu erwähnen ist, dass die RHDV2-bedingte Depopulation von Wildkaninchenbeständen in bestimmten Regionen sowie die Beteiligung der Lagoviren am Populationsrückgang beim Feldhasen zu einschneidenden Veränderungen in den Ökosystemen mit gravierenden Folgen auch für die Prädatoren in den betroffenen Regionen (Verlust der Futtergrundlage) führen.

Verbreitung und Persistenz der Lagoviren werden durch die hohe Umweltstabilität der Erreger selbst bei sommerlichen Temperaturen und Austrocknung gefördert. Bei höheren Temperaturen (bis 50°C) und Trockenheit bleiben die Viren etwa 3 Monate stabil, getrocknet bei Raumtemperatur mindestens 15 Wochen. In Kadavern hält sich das Virus bei 10 bis 20°C länger als 7 Monate.

Klinisches Bild der RHD

Beide RHDV-Genotypen führen bei ungeimpften Tieren nach einer Inkubationszeit von 1 bis 3 Tagen und innerhalb von 12 bis 36 Stunden nach dem Auftreten von Fieber und untypischen Krankheitsanzeichen wie Apathie, Unruhe oder Fressunlust zu plötzlichen Todesfällen. Dies kann mit respiratorischen und neurologischen Erkrankungen sowie Blutungsneigung (Verbrauchskoagulopathie) verbunden sein. Häufig sind Dyspnoe, Krämpfe, Opisthotonus und Schreien zu beobachten.

Das pathologische Bild kann hämorrhagische Lebernekrosen (Abb. 2), Gastroenteritis, Splenomegalie und Lungenödeme aufweisen (Abb. 3). Punkt- oder Flächenblutungen können ebenfalls beobachtet werden. Der Beinamen „Bunny Ebola“ oder „Kaninchen-Ebola“ ist in Bezug auf Organveränderungen und Aggressivität der Erkrankung absolut zutreffend, wenn auch zwischen den verursachenden Viren keinerlei Verwandtschaftsbeziehungen bestehen. RHDV2 ist anhand der Krankheitssymptome nicht von der klassischen RHD zu unterscheiden. Die Mortalitätsraten variieren stark (60–100 Prozent) und hängen von Virusstamm, Alter und Allgemeinzustand der Tiere ab.

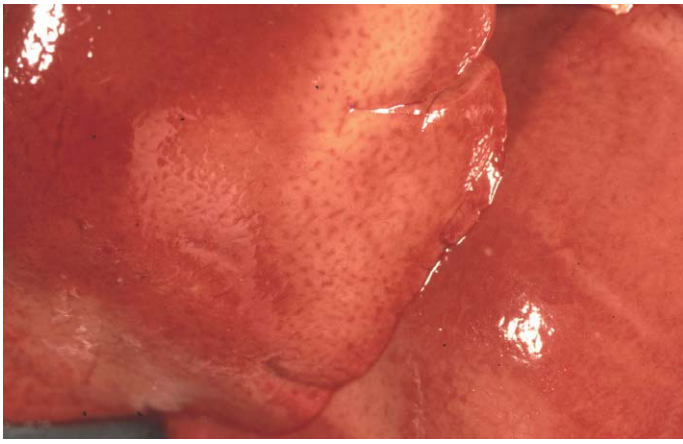


Abb. 2: Makroskopisches Bild einer fulminanten nekrotisierenden Hepatitis mit sehr deutlicher Lappchenzeichnung und peripheren netzartigen Nekrosen (hellbeige) [2].

© Jens Peter Teilke, ATB, FLI Insel Riems

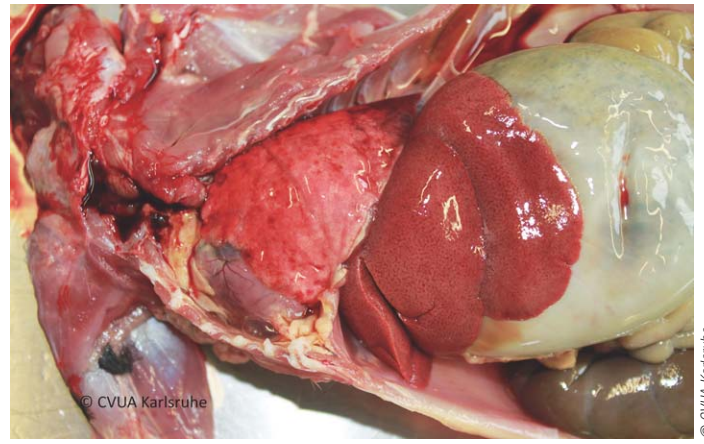


Abb. 3: Blick auf die Organe in situ bei einem an RHDV2 verendeten Kaninchen – Lunge mit Blutungen und Ödem, Lebernekrosen; Magen und Därme gut gefüllt (perakutes Eintreten des Todes).

© CVUA Karlsruhe

Was unterscheidet die beiden RHDV-Genotypen?

Anhand von Krankheitsverlauf oder pathologisch-morphologischen Veränderungen können die Erreger nicht differenziert werden. Auffällig sind RHDV2-induzierte Todesfälle bei sehr jungen Tieren, sogar im Alter von etwa 4 Wochen. Im Gegensatz zur Nestlingsimmunität bei der klassischen RHD bis zu einem Alter von ca. 10 Wochen existiert praktisch keine angeborene Immunität gegen RHDV2. Des Weiteren sind auch diverse Hasenarten für RHDV2 empfänglich, u. a. der Feldhase (*Lepus europaeus*) und der Schneehase (*Lepus timidus*).

Diagnose

Pathologisch-anatomische Untersuchungen können auf RHD hindeuten, sind aber nicht beweisend. Leber- bzw. Organveränderungen wie auch Blutungen werden teilweise nicht beobachtet.

Das Virus lässt sich in Zellkultur nicht anzüchten, kann aber durch den Nachweis seiner Proteine (Antigen-ELISA¹) oder durch Genomnachweis (RT-PCR²) sicher identifiziert werden [3]. Moderne real-time-(RT-)PCR-Tests ermöglichen eine rasche Differenzierung der unterschiedlichen Lagoviren bei Kaninchen und Hasen.

Da die Tiere in der Regel perakut versterben, spielt der Antikörpernachweis eine untergeordnete Rolle.

Prophylaxe und Verbreitung

Desinfektion

Zur Desinfektion werden absolut viruzide Desinfektionsmittel verwendet, die zuverlässig gegen unbehüllte Viren wirken. Ein spezielles RHD-Kapitel ist auf der DVG-Homepage unter

„Infos für Anwender“ verfügbar. Geeignete Produkte sind in der Desinfektionsmittelliste der DVG zu finden (www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=2150).

Impfung

Ein sicherer Schutz von Hauskaninchen ist de facto alleine durch Biosicherheits- und Hygienemaßnahmen nicht realisierbar. Für die Impfstrategie ist es entscheidend, dass aktuell beide RHDV-Genotypen in Deutschland auftreten und daher eine Kombinationsimpfung unbedingt zu empfehlen ist. Um einen optimalen Impfschutz zu erhalten, ist den Impfpfehlungen der Ständigen Impfkommision Veterinärmedizin (StiKo Vet) zu folgen (<https://stiko-vet.fli.de/>).

Neue Impfstoffe vermitteln eine „Reduktion der Mortalität durch RHD2“ (Tab. 1). Bei Beachtung der Impfpfehlungen wird ein sehr guter Impfschutz erzielt, allerdings überleben einzelne Tiere die Infektion trotz Impfung nicht, worüber Tierbesitzer im Vorfeld dringend aufgeklärt werden sollten.

Epidemiologie

Die Anzahl der bestätigten Ausbrüche liegt seit einigen Jahren stabil auf einem relativ hohen Niveau. Da RHD weder anzeige- noch meldepflichtig ist, stehen keine deutschlandweiten

Ausbruchsstatistiken zur Verfügung. Die vom FLI gesammelten Meldungen setzen sich aus eigenen Untersuchungen und den freiwilligen Meldungen eines Großteils der staatlichen und privaten veterinärmedizinischen Einrichtungen der Bundesländer zusammen. Daher spiegeln die Fallzahlen (Tab. 2) und Verbreitungskarten (Abb. 4) die wahren Ausbrüche nicht vollständig wieder, geben aber einen repräsentativen Überblick über das Infektionsgeschehen. Allerdings ist von einer sehr viel höheren Dunkelziffer von nicht untersuchten Todesfällen durch RHD-Ausbrüche auszugehen.

Das DVG-Konsiliarlabor für RHDV

Das DVG-Konsiliarlabor für RHDV gehört zum Institut für Virusdiagnostik (IVD) des FLI auf der Insel Riems und führt eine historische Tradition des Forschungsinstituts fort. Horst Schirrmeyer pflegte am Standort Insel Riems seit den 1990er-Jahren Grundlagenforschung, Struktur- und Diagnostik des RHDV [4]. Er war Wegbereiter moderner RHDV-Diagnostik und maßgeblich an der Erforschung neuer Vakzinen beteiligt [5]. In Zusammenarbeit mit Günther Keil wurden erfolgversprechende moderne Impfansätze entwickelt (*edible vaccines*, rekombinante Impfstoffe).

Impfstoff	Komponenten	Hersteller	Zulassung	Besonderes
Eravac	RHDV2	Laboratorios Hipra S.A., Spanien	EU/2/16/199-/001-002	inaktiviert, Leberbasiert, monovalent
Filavac VHD K C+V	RHDV/RHDV2	FILAVIE, Roussay, Frankreich	PEI.V.11900.01.1	inaktiviert, Leberbasiert, bivalent
Nobivac Myxo-RHD Plus	Myxomatose, RHDV/RHDV2	Intervet International BV, Niederlande	EU/2/19/244/001-003	Lebendvakzine, rekombinant, trivalent

Tab. 1: Übersicht über die in den letzten Jahren neu zugelassenen Impfstoffe gegen RHDV/RHDV2.

¹ engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

² Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)

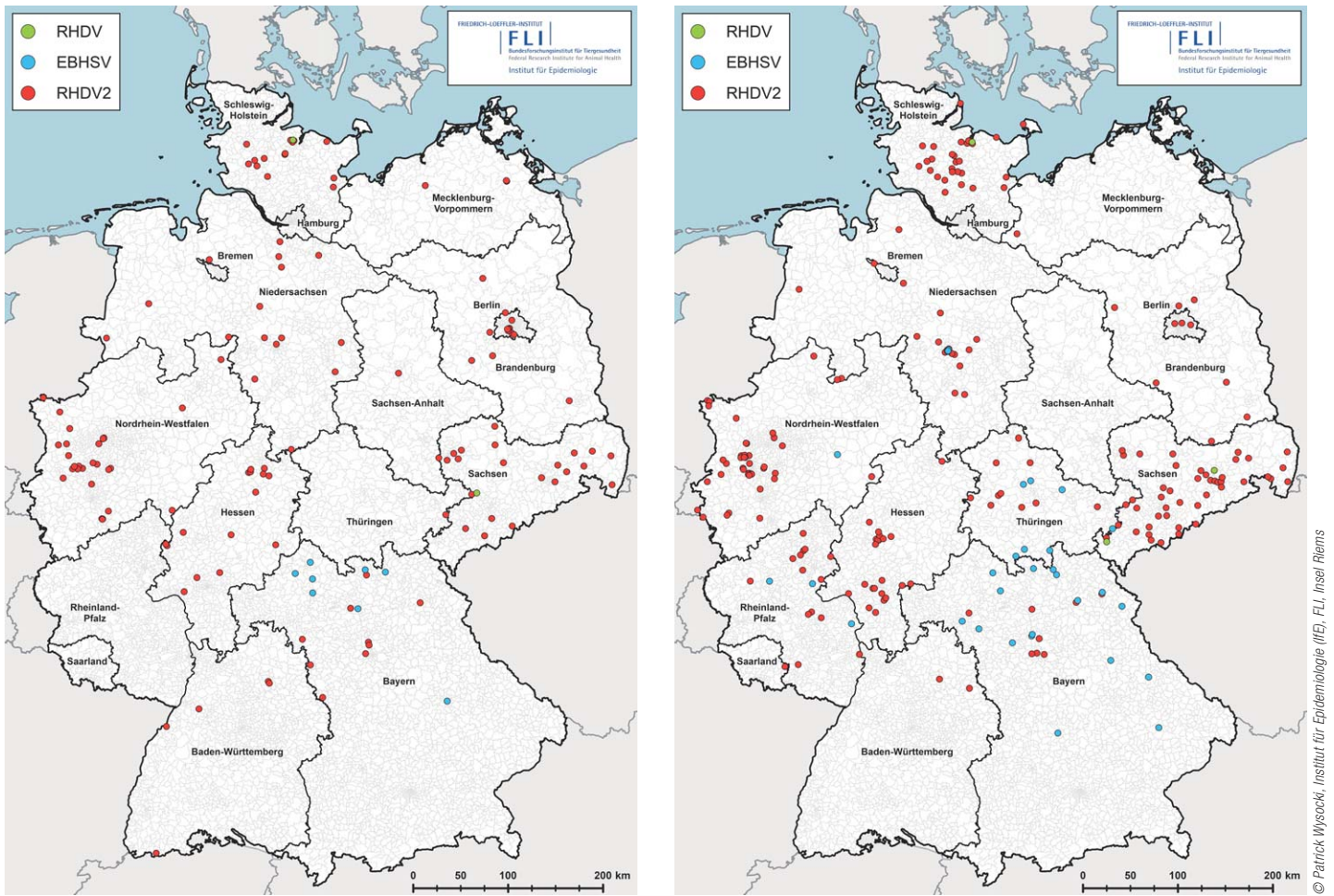


Abb. 4: RHDV-, RHDV2- und EBHSV-Ausbrüche in Deutschland 1. Halbjahr 2019 (links), 2. Halbjahr 2019 (rechts)

2019	Ausbrüche	Prozent
gesamt	377	100
RHDV	5	1
RHDV2	332	88
EBHSV	40	11

Tab. 2: Fallzahlen in Deutschland 2019.

Gregor Meyers und Heinz-Jürgen Thiel machten sich am Standort Tübingen um die Strukturaufklärung und molekulare Charakterisierung von Lagoviren verdient. Die Arbeitsgruppe von Meyers beschäftigte sich vorrangig mit Translations- und Prozessierungsmechanismen von Noro- und Caliciviren und generierte mit der Sequenzierung eines deutschen Isolats die erste Vollständigengenomsequenz eines RHDV. Heinz-Jürgen Thiel, Bernd Haas und Volker Ohlinger betrieben zudem Grundlagenforschung und diagnostische Weiterentwicklung auf dem Feld der Lagoviren RHDV und European Brown Hare Syndrome Virus (EBHSV).

Alle Diagnostiklabore des FLI sind in der Qualitätssicherung und -kontrolle nach ISO 17025 national und international akkreditiert (ILAC-MRA/DAkKS³). Das Konsiliarlabor für

RHDV, ein Labor der Sicherheitsstufe L2 einschließlich der entsprechenden Versuchstierhaltungen, führt im FLI-Laborverbund Untersuchungen auf Lagoviren (RHDV, RHDV2, European Brown Hare Syndrome Virus – EBHSV) mittels Elektronenmikroskopie (Abb. 5), Antigen- und Antikörper-ELISA, differenzierendem Genomnachweis, Hämagglutinationstest und Erregersequenzierung durch. Dabei werden umfangreiche Daten für Viruscharakterisierungen und Abschätzung zur Ausbreitung der Viren gewonnen. Die Laborleitung liegt in den Händen von Dr. Patricia König, die Stellvertretung obliegt Dr. Kerstin Wernike, beide Fachtierärztinnen für Virologie. Maria Justiniano-Suarez vervollständigt als ausgebildete Medizinisch Technische Assistentin die Stammbesetzung des Labors.

Zu den Hauptaufgaben des Konsiliarlabors zählen **diagnostische Abklärung und Bestätigungsuntersuchungen** in Amtshilfe für Veterinäruntersuchungseinrichtungen, Weiterentwicklung der Diagnostik sowie Kooperationen mit nationalen und internationalen Forschungs- und Untersuchungsstellen. Im Zuge dieser Zusammenarbeit wurden z. B. im vergangenen Jahr 135 Einsendungen mit 340 Einzelproben untersucht. Einsendungen von Tier-

haltern oder Tierärzten können nur aus wissenschaftlich begründetem Interesse und zur weiterführenden Charakterisierung bearbeitet werden (z. B. Impfversager, Impfschutz bei Jungtieren, Verdacht neuer Varianten). Routineuntersuchungen für die RHDV-Diagnostik werden von den lokalen Veterinäruntersuchungseinrichtungen durchgeführt.

Durch die Diagnostik am RHD-Labor wurde u. a. der Erstnachweis von RHDV2 in Deutschland, den Niederlanden, Dänemark und der Elfenbeinküste ermöglicht. Die molekulare Analyse von Virusstämmen aus der Isolatesammlung der letzten 25 Jahre wurde in einer Veröffentlichung zusammengefasst [6].

Vom Konsiliarlabor für RHDV werden Antigene und Antiseren für Untersuchungseinrichtungen als **Referenz- und Kontrollmaterial** bereitgestellt. Die letzte Laborvergleichsuntersuchung (Ringtest) wurde 2018/19 organisiert. Hier ließ sich in den teilnehmenden Untersuchungseinrichtungen ein hohes Niveau der RHDV-Diagnostik bestätigen. Eine Anpassung der Diagnostik an die aktuelle Epidemiologie erfolgte im Oktober 2019 mit Ergänzungen z. B. zu den Befundinterpretationen (AVID⁴-Methode VIRO1: Diagnostik von RHD und EBHS).

³ ILAC: International Laboratory Accreditation Cooperation; MRA: ILAC Mutual Recognition Arrangement; DAkKS: Deutsche Akkreditierungsstelle

⁴ AVID: Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik, Fachgruppe der DVG

Ergänzend zur Theorie wird auch Training von Laborpersonal am Standort Insel Riems angeboten. Über digitalen Medien (FLI-Homepage) werden Informationen und Hinweise zu Erkrankung, Seuchenlage und verfügbaren Impfstoffen bereitgestellt (z. B. Verbreitungskarten, Steckbriefe). **Beratungen** können telefonisch, über E-Mail oder die Informationsadresse der FLI-Homepage erfolgen. Zahlreiche **Anfragen** von Tierärzten, Tierhaltern und Verbänden gehen zu den Schwerpunktthemen Desinfektion, Impfung und Diagnostik ein und werden in Zusammenarbeit mit der Pressestelle des FLI bearbeitet.

Neben ausgedehnten **Kooperationen** mit staatlichen und privaten Diagnostiklaboren mit Schwerpunkt Proben- und Materialaustausch und Zusammenarbeit bei aktuellen diagnostischen Fragestellungen und Problemen werden mit der Freien Universität Berlin, Institut für Tierpathologie, und der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover [7], Institut für Pathologie, spezielle Aspekte der RHDV-Epizootie und insbesondere die histologische Charakterisierung von RHDV untersucht [8]. Zusammenarbeiten mit Institutionen aus Nachbarländern zu Diagnostik, Typisierung, molekularer Charakterisierung und Immunisierung existieren seit einigen Jahren (Avecur Animal Health Support, Niederlande; Dänemark Statens Serum Institute, Copenhagen University).

Untersuchungen zum Virus- und Antikörpernachweis werden in Gemeinschaft mit verschiedenen Einrichtungen durchgeführt, um die potenzielle Bedeutung von Lagovirusinfektionen für Feldhasenpopulationen aufzuklären (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung (ITAW), Büsum, und Institut für Pathologie, Hannover; Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Wildlife Research Institut, Bonn).

2019 kam in bestimmten Regionen Deutschlands eine deutlich erhöhte Zahl von verstorbenen Feldhasen zur Untersuchung. In den meisten Einsendungen wurde EBHSV nachgewiesen, der Anteil RHDV2-infizierter Hasen war überraschend gering. Die Tiefensequenzierung von repräsentativen Stämmen ergab keine Hinweise auf eine veränderte Virulenz der zirkulierenden Viren.

Ausblick

Neben der Aktualisierung und Weiterentwicklung der Diagnostik wird die Sammlung von Isolaten weiter betrieben und über Hochdurchsatzsequenzierung eine regelmäßige

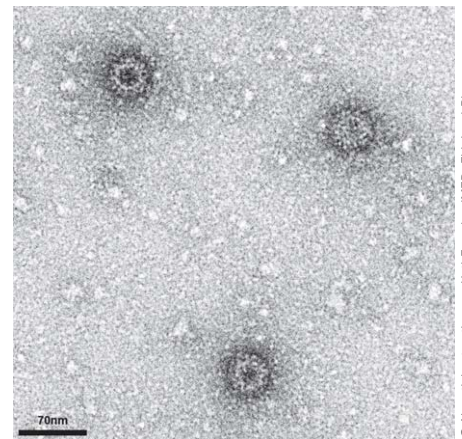
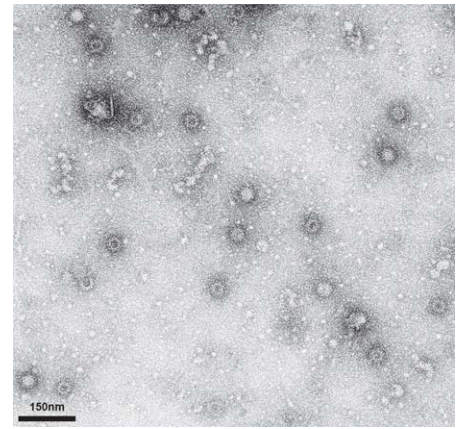
molekulare Analyse der zirkulierenden Stämme angestrebt, da insbesondere Veränderungen der immunogenen Strukturen der Viren Aussagen über die Belastbarkeit des Impfschutzes ermöglichen können. Pathogenitätsstudien sowie Forschungsarbeiten zur Impfstoffentwicklung gehören zu weiteren wichtigen Aufgaben des DVG-Konsiliarlabors für RHDV.

Danksagung

Spezieller Dank gilt den Kolleginnen und Kollegen aus Untersuchungseinrichtungen und Praxis sowie Tierhaltern, die uns mit der Überlassung von Informationen und Probenmaterial in die aktuellen Infektionsgeschehen einbinden und mit ihren gesammelten Daten die Erstellung der Verbreitungskarten ermöglichen.

Literatur

- [1] Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeu S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guérin JL, Lemaitre E, Decors A, Boucher S, Le Normand B, Capucci L (2013): Emergence of a new lagovirus related to Rabbit *Haemorrhagic Disease Virus*. *Vet Res.*, 44(1): 81.
- [2] Teifke JP, Reimann I, Schirrmeier H (2002): Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *J Comp Pathol.*, 126(2–3): 231–234.
- [3] Gall A, Schirrmeier H (2006): Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus genome in vaccinated rabbits after experimental infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53(8): 358–362.
- [4] Granzow H, Weiland F, Strebel HG, Liu CM, Schirrmeier H (1996): Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res.*, 41(2): 163–172.
- [5] Mikschofsky H, Hammer M, Koenig P, Keil G, Schirrmeier H, Broer I (2007): Plant Made Veterinary Vaccines against RHD. *Journal of Biotechnology*, 131: 2.
- [6] Szillat KP, Höper D, Beer M, König P (2020): Full-genome sequencing of German rabbit haemorrhagic disease virus isolates uncovers recombination between RHDV (Gl.2) and EBHSV (Gl.1). *VEVOLI-2020–153*; European Union's Horizon 2020 research and innovation program HONOURS. Eingereicht zur Publikation.



© Negativkontrastierung, Kati Franzeke, IMED, FLI, Insel Riems

Abb. 5: Elektronenmikroskopischer Nachweis von RHDV2 in einer Leberanreicherung. In der Detailaufnahme unten sind die Kapside mit den namensgebenden kelchförmigen Oberflächenstrukturen und dem dichten viralen Erbgut zu erkennen.

- [7] Bühler M, Jesse ST, Kueck H, Lange B, Koenig P, Jo WK, Osterhaus A, Beineke A (2020): Lagovirus europaeus Gl.2 (rabbit hemorrhagic disease virus 2) infection in captive mountain hares (*Lepus timidus*) in Germany. *BMC Vet Res.*, 16(1): 166.
- [8] Hänke GG, Bertram CA, Schuhmann B, König P, Müller K: Death in RHDV2-vaccinated pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) due to rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). Eingereicht zur Publikation.

Korrespondierende Autorin

Dr. Patricia König



Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Südufer 10, 17493 Greifswald – Insel Riems, Tel +49 38351 71141, patricia.koenig@fli.de