

Prävalenzerfassung und Monitoring von Zoonoseerregern in Wildtieren in Brandenburg

Martin Richter

Symposium Zoonosen und Lebensmittelsicherheit, 04. – 05.11.2019 Berlin

Studienzentrum für Landnutzungsbezogene Bewertungsverfahren und One Health (LaBeOH)

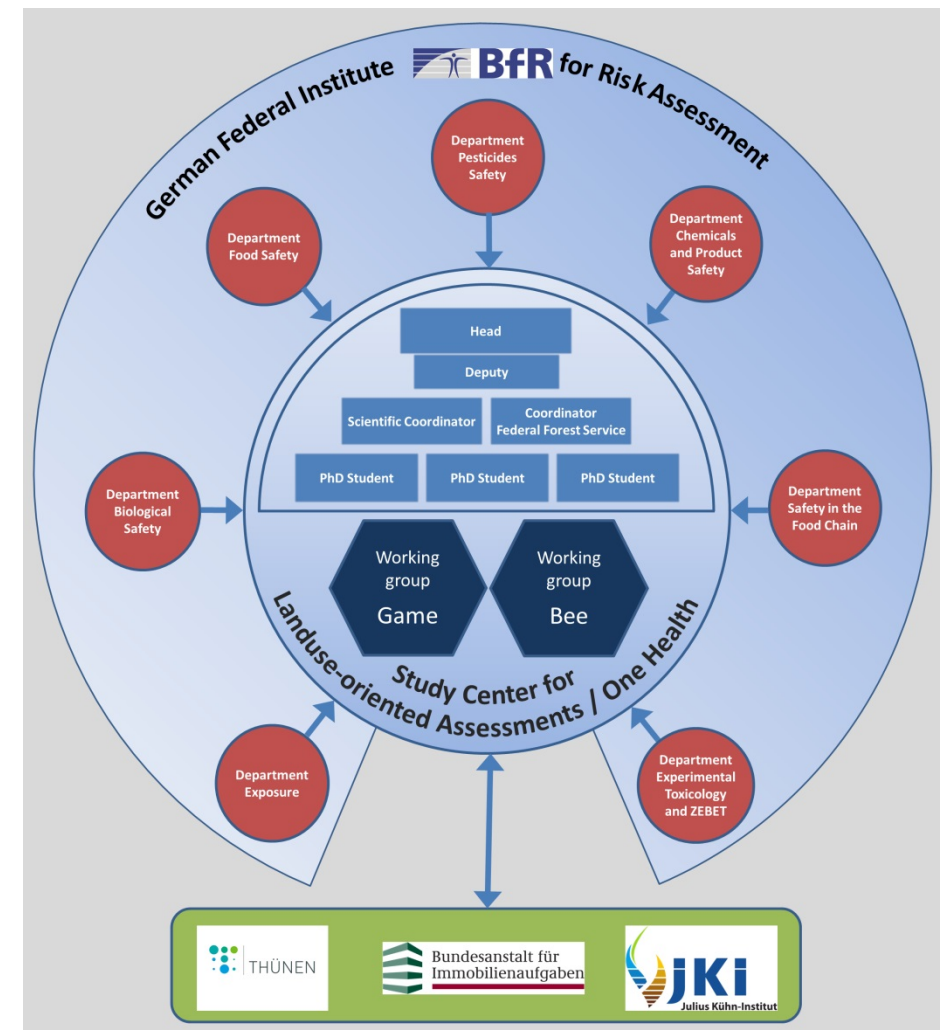
Wildtiere, Wildtiergesundheit und Kontaminanten aus Wildtieren

Kontaminanten:

Schwermetalle
Radioaktivität
Geschossrückstände
Zoonosen

Exposition:

Risiko prinzipiell abhängig von Kontakt (Zubereitung), Verzehrsmengen
(Unterschiede zwischen Bevölkerungsgruppen)



Wildtiergesundheit und Zoonoseerreger sowie Kontaminanten aus Wildfleisch

Situation:

Die Datenlage zum tatsächlichen Vorkommen von humanpathogenen Erregern und anderen Kontaminanten in Wild in Deutschland ist nicht umfangreich oder unzureichend und es besteht generell Forschungsbedarf.

Das BfR hat deshalb bereits Stellungnahmen und Risikobewertungen im Sinne des Verbraucherschutzes veröffentlicht, in denen auf die geringe Datendichte hingewiesen wird.

Das BfR führt daher eigene Studien zur Verbesserung dieser Datenlage durch.

Gesundheitliche Bewertung des BfR



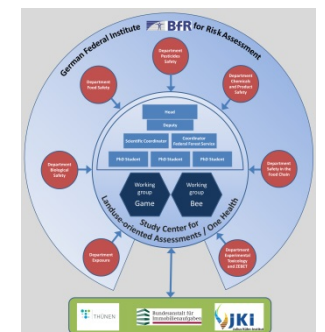
Bundesinstitut für Risikobewertung

DOI 10.17590/20181221-095937-0

Wildfleisch: Gesundheitliche Bewertung von humanpathogenen Parasiten

Stellungnahme Nr. 045/2018 des BfR vom 21. Dezember 2018

Fleisch von freilebendem Wild wie Reh, Hirsch und Wildschwein ist nährstoffreich, fettarm und wird nachhaltig gewonnen. Es kann allerdings Parasiten enthalten, die den Menschen auch krank machen können, wenn das Fleisch nicht hygienisch einwandfrei zubereitet wird. Bei der fleischhygienerechtlichen Beurteilung von erlegtem Wild gibt es immer wieder Unklarheiten, etwa in welchen Teilen des Tierkörpers bei befallenen Tieren bestimmte Parasiten vorkommen können. Dies liegt unter anderem daran, dass wenige Daten zu den spezifischen Krankheitserregern in Wildtieren verfügbar sind. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat daher ausgewertet, in welchen Wildtierarten und deren Organen die unten genannten Parasiten bisher nachgewiesen wurden und wie häufig solch ein Befall war. Daraus hat das BfR das Risiko einer parasitär bedingten Erkrankung durch den Verzehr von Wildfleisch abgeschätzt und Vorschläge unterbreitet, wie Verbraucherinnen und Verbraucher solche Erkrankungen vermeiden können.



Monitoring-Programm Zoonosen in Wildtieren

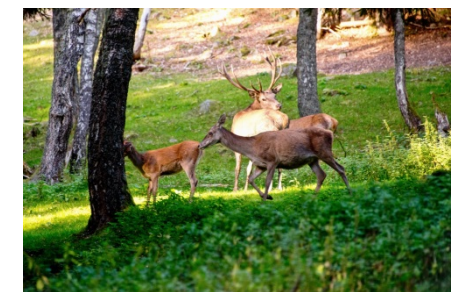
Fragen

- Welche Zoonosen finden wir in Wildtieren?
- Wie sind die Prävalenzen wichtiger Zoonosen in den Wildtierbeständen?
- Emerging or Re-emerging pathogens, Wirtsanpassungen?
- Wie gelangen die Erreger vom Tier zu uns?
- Risiko alimentärer Ansteckung?
- Welche Folgen hat der Klimawandel auf das Erregerspektrum und die Erregerökologie?
- Welche Faktoren tragen insbesondere zu einer Erregerpersistenz im sylvatischen Raum bei?



Monitoring Zoonoseerreger in Wild

- Institutsübergreifendes Projekt
 - Kooperationsprojekt mit Bundesanstalt für Immobilienaufgaben, Geschäftsbereich Bundesforst
 - Zunächst in Brandenburg
 - Probenahme durch Begleitung während der Jagdsaison
 - Tierarten:
 - Wildschwein (*Sus scrofa*)
 - Rehwild (*Capreolus capreolus*)
 - Rotwild (*Cervus elaphus*)
 - Damwild (*Dama dama*)
 - Muffelwild (z.B. *Ovis ammon musimon*)
- Außerdem:
- Fuchs (*Vulpes vulpes*)
 - Waschbär (*Procyon lotor*)
 - Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*)



Monitoring of zoonotic pathogens in wildlife in Brandenburg, Germany

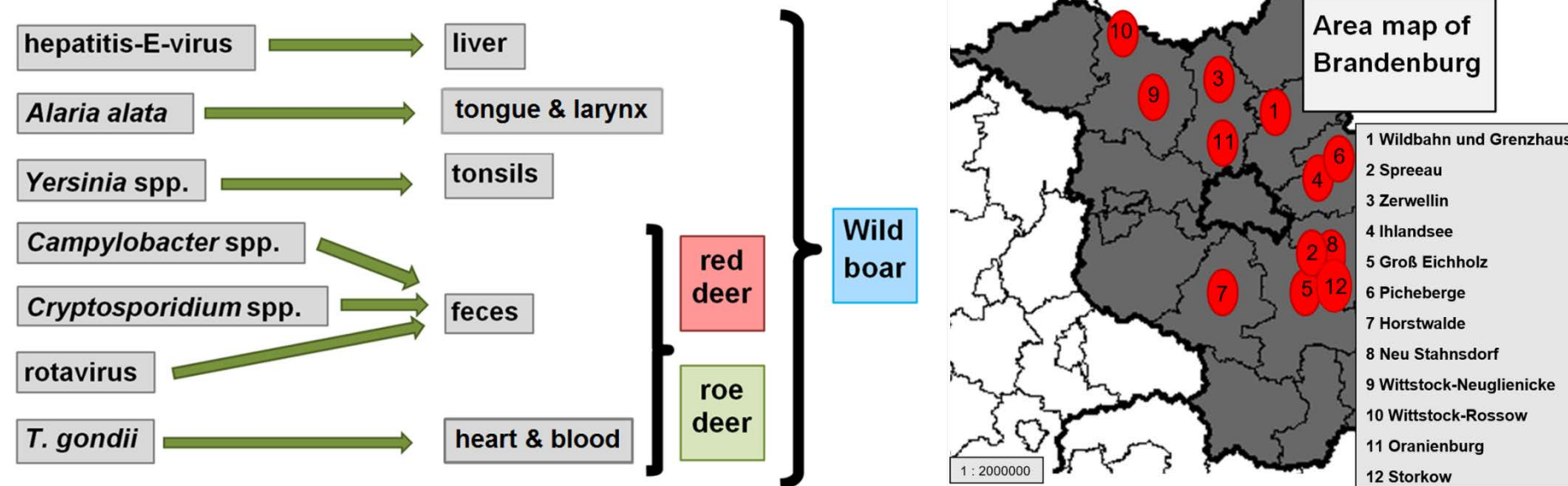
K.C. Stollberg, N.S. Bier, C. Jäckel, C. Kästner, S. Hertwig, K. Stingl, N. Althof, C. Gremse, A. Johne, A. Mayer-Scholl, N. Bandick, M. Lahrssen-Wiederholt, K. Nöckler, and M. H. Richter

German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department for Biological Safety, Berlin, Germany

Background

Game is an important reservoir for many zoonoses and plays a key role in their epidemiology (Kruse *et al.*, 2004). As game meat consumption has increased in Germany in the past years, monitoring of zoonotic pathogens in game has also gained importance. Yet, information on the prevalence of different pathogens in game is still sparse. The purpose of this study is to generate new insights into the prevalence, epidemiology and ecology of various zoonotic pathogens in wildlife carrying the potential for public health burden emanating from the following viral, bacterial and parasitic zoonotic agents: *Toxoplasma gondii*, *Alaria alata*, *Cryptosporidium* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., rotavirus and hepatitis-E-virus.

Study Design



Während der Studien wurde das Probenahmespektrum im Rahmen der Möglichkeiten erweitert: Fettgewebe (Bauch), Diaphragma (Zwerchfellmuskulatur) und Vorderlaufmuskulatur

Overview of pathogens currently included in the study



Parasites

Cryptosporidium spp.

Background:

- protozoan parasite with a low infectious dose (10-100 oocysts) that causes gastroenteritis in numerous hosts

Methods:

- wild boar, roe deer, and red deer feces were investigated using nested PCR protocol targeting three loci (COWP, 18S rRNA and GP60)

Alaria alata

Background:

- mesocercariae have been detected in wild boar as incidental finding during Trichinella examination
- wild boars are considered to be paratenic hosts

Methods:

- tongue and layrnx of wild boars are investigated for *Alaria alata* via *Alaria* spp. mesocercariae migration technique (Riehn *et al.*, 2010).

Preliminary results:

- mesocercariae were found in 26% (16/61, 95% CI:15,8-39%) of the samples
- 422 mesocercarie were collected
- Protein extracted from the collected mesocercarie will be used to develop a novel detection and identification method for *Alaria alata* using MALDI-TOF-MS

Toxoplasma gondii

Background:

- protozoan parasite causing toxoplasmosis
- raw or undercooked game is a potential source for infection

Methods:

- meat juice of heart muscle and serum was tested by a commercially available ELISA assay (ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species by IDVet)
- where available 5g of heart muscle were analyzed by qPCR targeting the 529 bp-repeated element
- where available 50 g of heart muscle were analyzed using pepsin digestion combined with qPCR and/or a mouse bioassay

Perspective:

- comparison of methods for *T. gondii* tissue cysts in game meat
- use of serological as well as molecular detection methods to assess whether there is correlation between seropositivity and actual presence of *T. gondii* tissue cysts in game

Overview of pathogens currently included in the study



Bacteria

Campylobacter spp.

Background:

- the most common reported cause of bacterial diarrhoea in Germany
- most infections caused by consumption of raw undercooked meat or through intake of contaminated foodstuffs or water
- contamination of food and water primarily occurs through feces from animals that are infected with or are colonised with *Campylobacter* spp.

Methods:

- feces of roe deer and wild boar underwent a cultural examination for *Campylobacter* spp..

Yersinia spp.

Background:

- although symptoms may vary with age fever, abdominal pain, and diarrhoea are common signs of yersiniosis
- wild boar as well as domestic pigs are considered to be the most important animal reservoir for *Y. enterocolitica*
- *Y. pseudotuberculosis* is also commonly isolated from wild animals

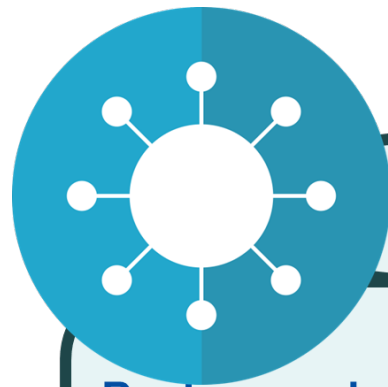
Methods:

- tonsils and feces underwent cultural enrichment steps followed by PCR targeting the ail-gene and wzz-gene
- all samples positive for the ail-gene were later plated onto CIN-agar-plates
- Spot assays were used to screen the samples for Yersinia-specific phages

Preliminary results:

- only three samples of wild boar tonsils tested positive for the ail-gene by PCR
- through spot testing on eight *Y. enterocolitica*- and 14 *Y. pseudotuberculosis*-strains, 5 phages were detected and isolated.

Overview of pathogens currently included in the study



Viruses

rotavirus

Background:

- the most common cause of diarrhoea in children worldwide
- very low infectious dose of 10 virus particles, risk for infection is high, especially for children

Methods:

- fecal samples of wild boar (*Sus scrofa*) were tested for rotavirus using qPCR targeting a 80-nucleotide sequence within NSP3

hepatitis-E-virus

Background:

- in 2017, 2943 cases were reported in Germany and the number of cases has been increasing continuously
- domestic pigs are an important reservoir for hepatitis-E-virus and it is assumed that wild boar is an important reservoir as well

Methods:

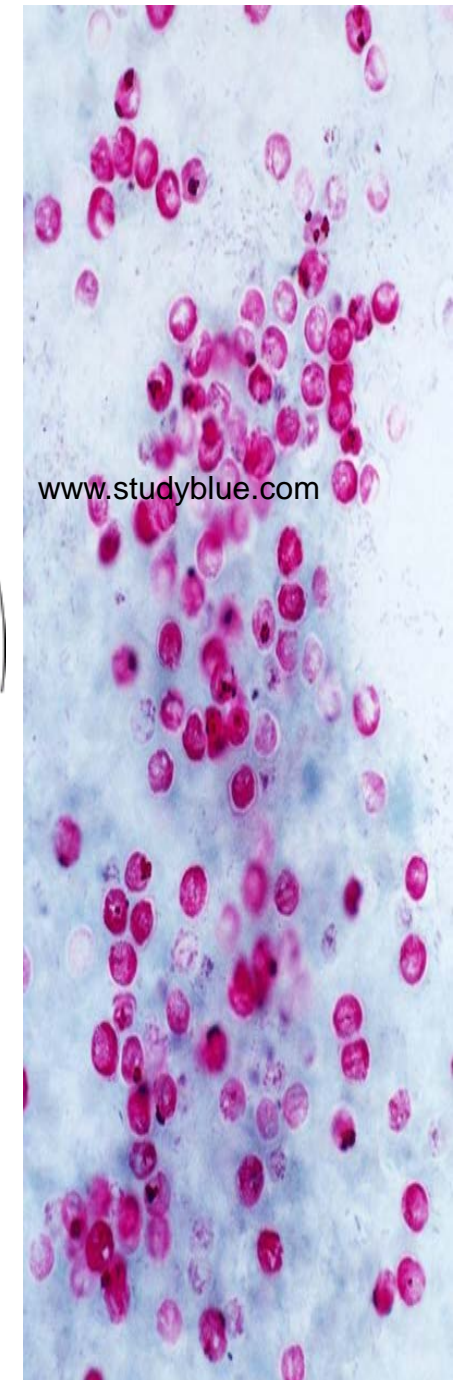
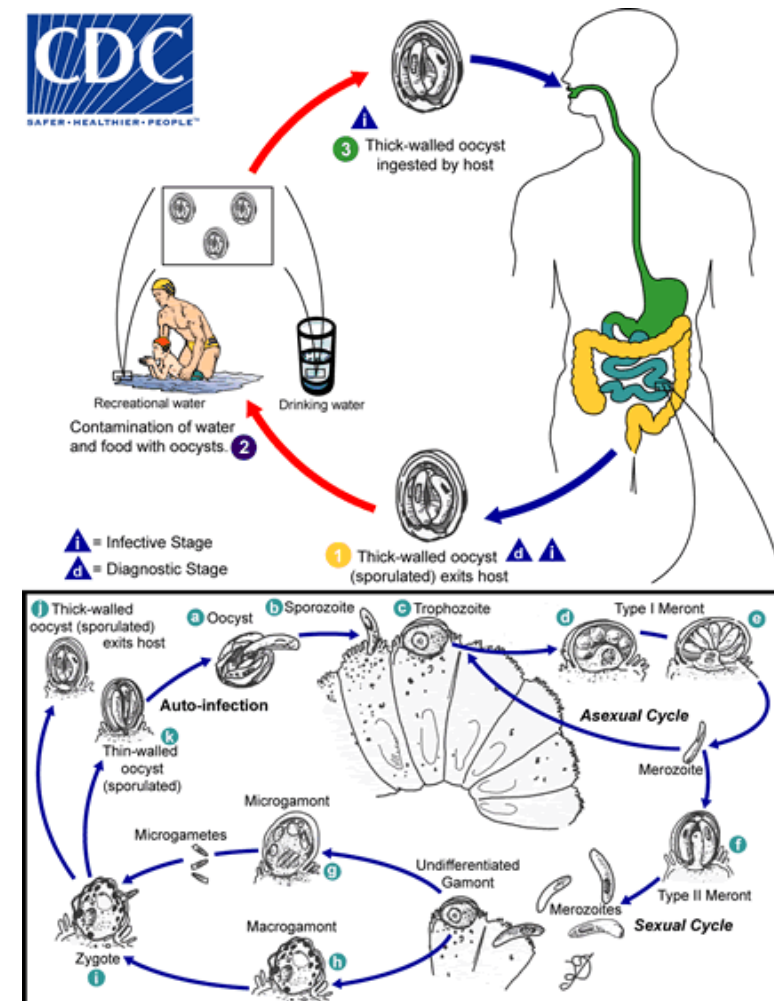
- liver of wild boar (*Sus scrofa*) was examined for hepatitis-E-virus using qPCR targeting a 70-nucleotide sequence within ORF 3



Results: prevalence studies

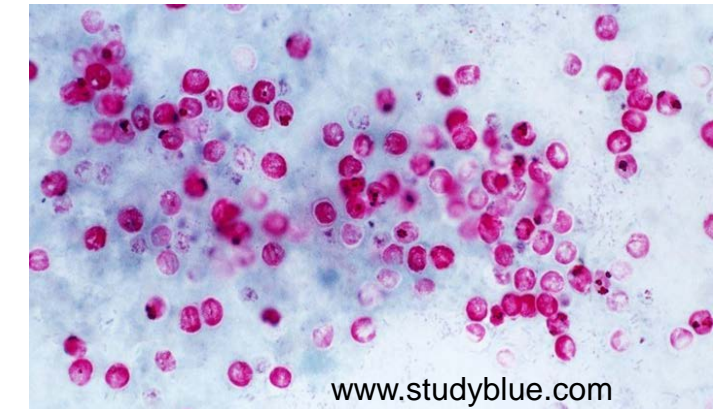
Kryptosporidien – unterschätzte Erreger

- Wichtiger Wasser-assoziiertes zoonotischer Erreger
- Infektion über:
 - verunreinigtes Trinkwasser
 - Kontaminierte Lebensmittel
 - Kontakt mit infizierten Personen/Tieren
- Lange Überlebensfähigkeit in der Umwelt (4 bis 6 Monate)
- Sehr widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse und Desinfektionsmittel
- Krankheitsverlauf:
 - Lang anhaltender wässriger Durchfall & Bauchschmerzen (Wochen)
 - Fieber
 - Gewichtsverlust
 - u.U. lebensgefährlich
 - Ökonomisch relevante Zoonose (schwere Tier, Nutztier und Humanerkrankungen)
- Meldepflichtig
- Womöglich unterrepräsentiert – selten diagnostiziert
- Jahreszeitbedingte Schwankungen beim Auftreten der Erkrankung (deutlich mehr Erkrankungen im Sommer)



Cryptosporidium – an underestimated pathogen

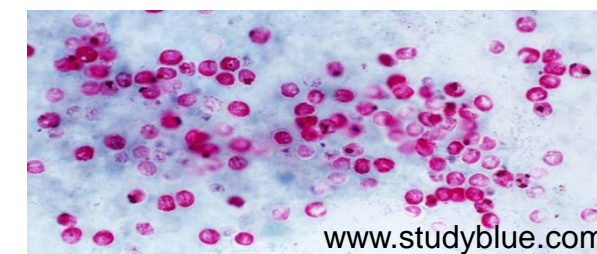
Species	2017/18		2018/19	
	n	Positive	n	Positive
Wild Boar	112	25 (24,11%)	72	8 (11,11%)
Roe deer	59	25 (42,37%)	54	1 (1,85%)
Red deer	38	4 (10,53%)	10	- (0%)



Langzeitmonitoring kann sinnvoll sein
 Junge und ältere Tiere stärker betroffen, AK0 > AK1 < AK2

Cryptosporidium – an underestimated pathogen

Species	2017/18		2018/19	
	n	Positive	n	Positive
Wild Boar	112	27 (24,11%)	72	8 (11,11%)
Roe deer	59	25 (42,37%)	54	1 (1,85%)
Red deer	38	4 (10,53%)	10	- (0%)

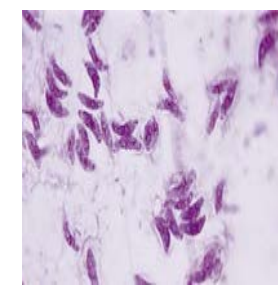
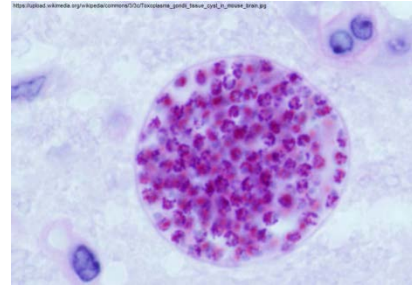
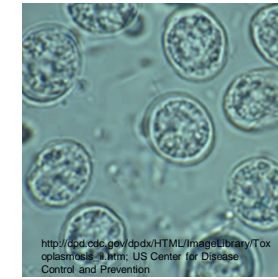
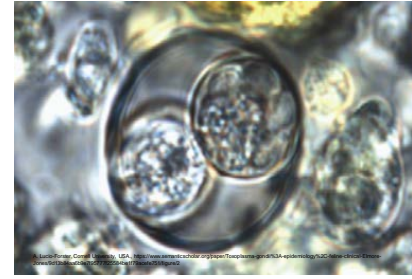


Timeframe	Temperature	Precipitation
Summer 2017	18.3 (mean) +0.3 (dev. long term mean)	241% (resp. long term mean)
Summer 2018	20.4 (mean) +2.4 (dev. long term mean)	49% (resp. long term mean)
Summer 2019	20.5 (mean) +2.5 (dev. Long term mean)	125% (resp. long term mean)

<https://www.wetterkontor.de/de/wetter/deutschland/monatswerte-station.asp>

Toxoplasma gondii - Erreger

- Protozoon
- obligat intrazelluläre Vermehrung
- großes Wirtsspektrum
- weltweites Vorkommen
- Erreger der Toxoplasmose
→ Eine der häufigsten parasitären
Zoonosen weltweit



• Taxonomie:

Stamm	<i>Apicomplexa</i>
Superklasse	<i>Sporozoa</i>
Klasse	<i>Coccidiomorphea</i>
Unterklasse	<i>Coccidia</i>
Ordnung	<i>Eimeriida</i>
Familie	<i>Sarcocystidae</i>
Unterfamilie	<i>Toxoplasmatinae</i>
Gattung	<i>Toxoplasma</i>
Art	<i>Toxoplasma gondii</i>

Toxoplasma gondii - Toxoplasmose

Toxoplasmose:

Bei immunkompetenten Menschen: meist inapparent

selten Fieber, Lymphadenopathien, Muskel- und Kopfschmerzen

Bei immungeschwächten Menschen: Encephalitiden, posteriore Uveitis, interstitielle Pneumonie,...

Bei pränataler Infektion:

bei Primärinfektion der Mutter je nach Alter des Fetus Abort, gestörte Entwicklung, Hydrocephalus, Chorioretinitis, ...
In Deutschland meldepflichtig!

Inkubationszeit:

2-3 Wochen

Diagnostik:

unter anderem ELISA, PCR

Therapie:

Spiramycin, Sulfadiazin, Clindamycin,...

Toxoplasma gondii

Infektion / Übertragung:

- Durch Aufnahme von Oozysten von kontaminiertem Gemüse, Wasser, Boden, Katzenstreu, ...
- Durch Bradyzoiten in Gewebezysten aus unzureichend gegartem Fleisch
(z.B. Schwein, Ziege, Schaf, **Wild**)
- prenatale Infektionen möglich und meldepflichtig



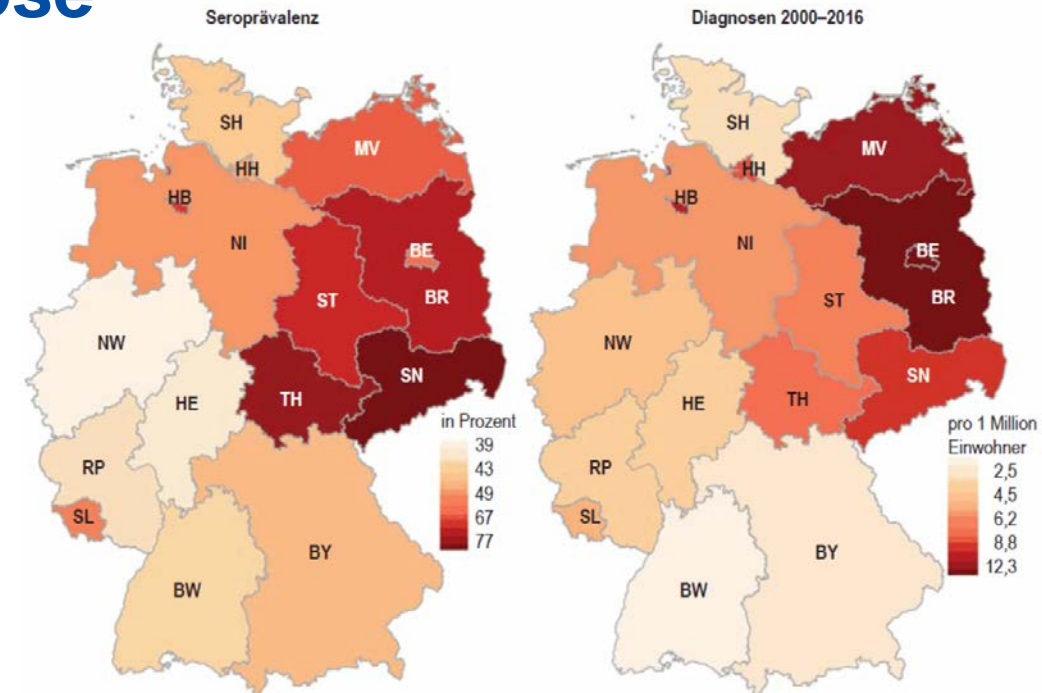
Toxoplasma gondii - Toxoplasmose

Seroprävalenz, Deutschland:

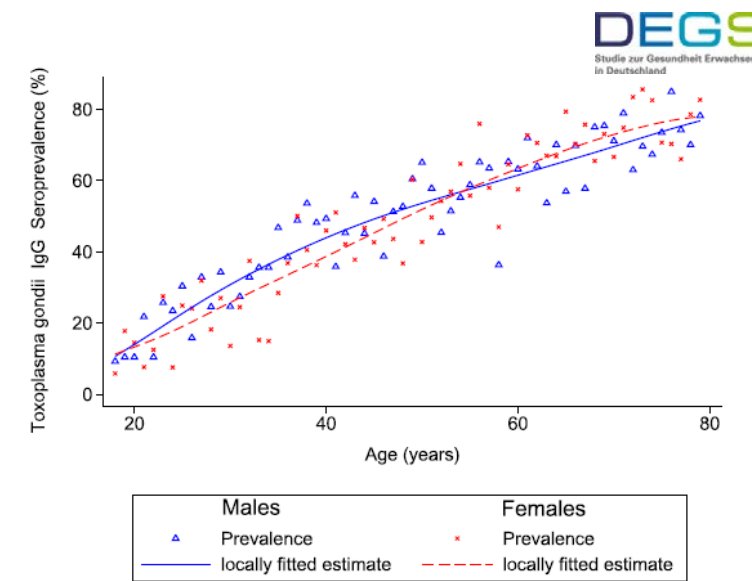
- 20,0% (18-29 Jahre)
- 55% (18-79 Jahre, 2008-2011)
- → 76,8% (70-79 Jahre)

Schätzungen, Deutschland:

- Inzidenz: 1.099 auf 100.000 Einwohner
- 74,1% aller Schwangerschaften gefährdet
- 6.393 Serokonversionen in Schwangerschaft
- 1.279 pränatalen Infektionen
- 345 Neugeborene mit klinischer Symptomatik



(Pleyer et al., 2019)



(Wilking, 2016)

Toxoplasma gondii – Ergebnisse 2017-18 / 2018-19



Seroprevalenz [%]	95%CI
7.41% (2/27) / 5.0% (1/20)	0.9-24.3% / 0.1 - 24.9%
15.7% (8/51) / 10.8% (8/74)	7.0-28.6% / 4.8 - 20.2%
24.1% (28/116) / 25.0% (16/64)	16.7-33% / 15.0 - 37.4%

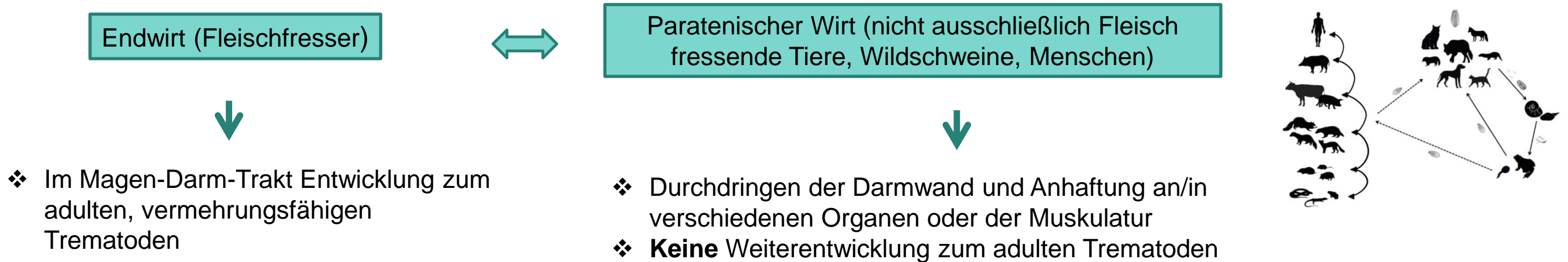


Seroprevalenz [%] nach Altersgruppe
AG0: 0% AG1: 11.1% AG2: 10.5% ($p = 0.399$)
AG0: 2.1% AG1: 13.0% AG2: 23.1% ($p = 0.004^*$)
AG0: 14.9% AG1: 24.7% AG2: 34.4% ($p = 0.08$)

Projekt *Alaria (A.) alata*

Hintergrund:

- Der Duncker'sche Muskelegel (DME) stellt ein Entwicklungsstadium (Mesozerkarie) des Trematoden *A. alata* dar, welches oral mit der Nahrung aufgenommen werden kann.



- In den letzten Jahren wurden im Rahmen der Trichinenuntersuchung beim Wildschwein immer wieder der Duncker'sche Muskelegel (DME) als Zufallsbefund nachgewiesen.
- Wenige Daten zur Prävalenz in Wildschweinen in Deutschland verfügbar. Aufgrund der bisherigen Datenlage kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Menschen durch den Verzehr von DME-infizierten Wildschweinfleisch erkranken können.

Projekt *Alaria (A.) alata*

Bisherige Untersuchungen und Ergebnisse:

Alaria alata

Background:

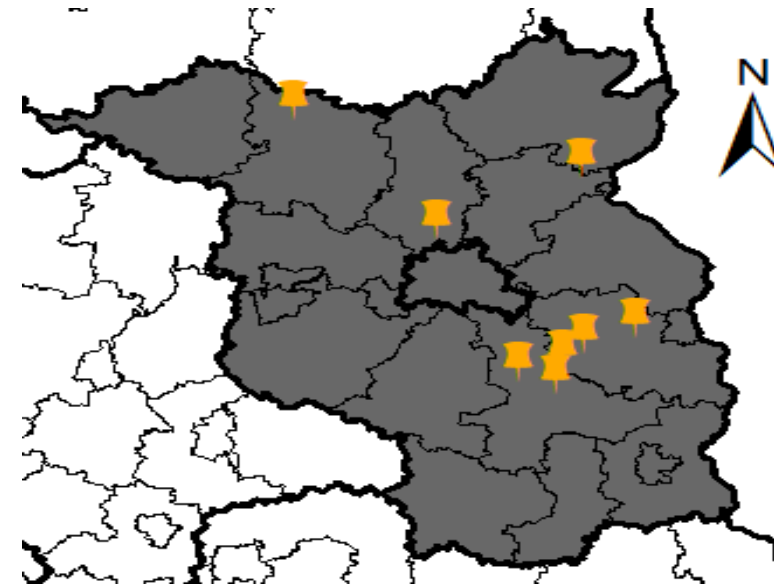
- mesocercariae have been detected in wild boar as incidental finding during *Trichinella* examination
- wild boars are considered to be paratenic hosts

Methods:

- tongue and layrnx of wild boars are investigated for *Alaria alata* via *Alaria* spp. mesocercariae migration technique (Riehn et al., 2010).

Preliminary results:

- mesocercariae were found in 26% (16/61, 95% CI:15,8-39%) of the samples
- 422 mesocercarie were collected
- Protein extracted from the collected mesocercarie will be used to develop a novel detection and identification method for *Alaria alata* using MALDI-TOF-MS



Übersicht über die im Rahmen der Treibjagden beprobten Reviere:
Angermünde, Groß Eichholz/Prieros, Niederlehme Ost, Niederlehme West, Oranienburg,Prieros
Neubrück, Storkow, Wittstock

- Es wurden jeweils Zunge, Abdominalfett, Zwerchfell – und Kaumuskulatur mittels AMT (*Alaria* spp. mesocercariae migration technique (AMT); spezifische Methode zum Nachweis von *A. alata*-Mesozerkarien im Gewebe) untersucht.

Hunting season 2017/2018



Hunting season 2018/2019

- **46/171 wild boar (27%)** positive for *A. alata* mesocercariae
- Total of **550 mesocercariae** were isolated

- **16/61 wild boar (26%)** positive for *A. alata* mesocercariae
- Total of **442 mesocercariae** were isolated

Yersinien - Yersiniose

Erreger

Fakultativ anaerobe, gram-negative Stäbchen, Familie: *Enterobacteriaceae*

Vorkommen

- Weltweit, sporadisch bis ausbruchartig
- Gehört zu den häufigsten bakteriellen Magen-Darm-Erkrankungen in Deutschland (*Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*)

Übertragung

- v.a. durch kontaminierte Nahrungsmittel **tierischer** (Wurst, Fleisch, nicht pasteurisierte Milch) und **pflanzlicher** (Gemüse, Salate) Herkunft

Außerdem

- verunreinigtes Trinkwasser
- direkter Kontakt zu infizierten Tieren (Haustiere, Wild)
- Mensch zu Mensch
- Bluttransfusion

Ansteckungsdauer

- Solange Erreger ausgeschieden werden (ca. 6 Wo)

Sonstiges

- Verbreitung des Krankheitserregers mit dem Blutstrom (Sepsis) möglich



Yersinien

Inkubationszeit

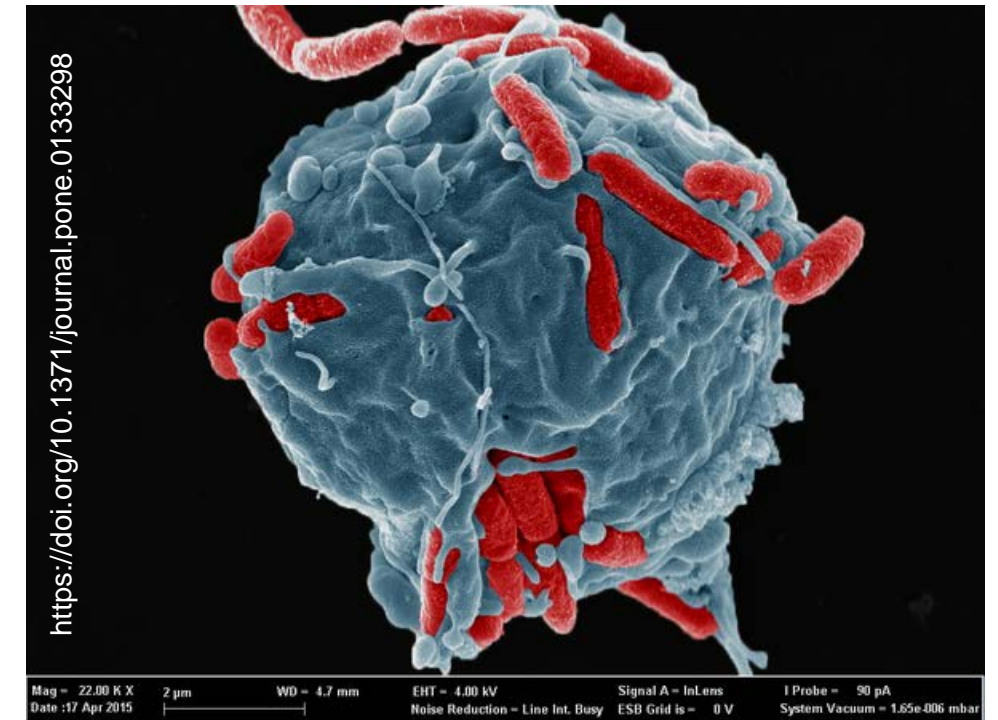
1 - 14 Tage (zumeist 3 - 7 Tage)

Symptome

Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Diarrhö, Pseudoappendizitis

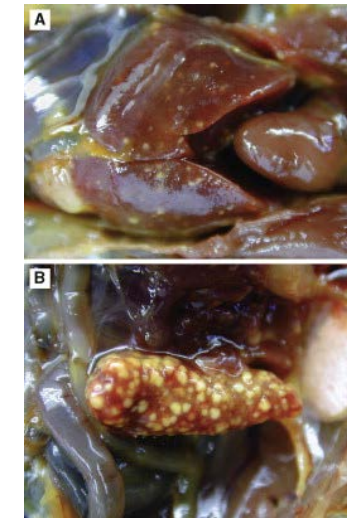
Differentialdiagnose

akute Blinddarmentzündung (Appendizitis)



Yersinien - Tonsillen

Species	2018/19			
	n	Positive		
Wild Boar	30	3 (10%)		
Roe deer				
Red deer				



Gerry M. Dorrestein,
in *Handbook of Avian Medicine (Second Edition)*, 2009



Jennifer Oosthuizen -
<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pic=21923>, Public

swollen, congested liver (A) and spleen (B) with small, yellow, focal bacterial granulomata. Many rod-shaped bacteria are seen. Diagnosis is confirmed after culturing the microorganisms.

- *Y. pseudotuberculosis*
- Alle Kotproben negativ (Schwarz-, Reh- u. Rotwild)
- Tonsillentnahme war nur bei 30x Schwarzwild möglich
- Kultivierung bisher nicht erfolgreich, vereinzelt pos. PCR (ail-gene)

Vielen Dank

Fachgruppe Diagnostik, Erregercharakterisierung und Parasiten in Lebensmitteln



Bundesinstitut für Risikobewertung

Technische Assistenz

Peter Bahn
Andrea Barac
Susanne Diescher
Cornelia Göllner
Sandy Kortebusch
Enno Luge
Jonas Nekat
Nicole vom Ort
Gabriela Schindhelm
Bogumila Schmidt
Beatrice Schwarz
Nora Thaben

WissenschaftlerInnen

Nadja Bier
Stefan Hertwig
Claudia Jäckel
Annette Johné
Anne Mayer-Scholl
Jana Sachsenröder
Smita Sutrave
Eckhard Strauch

HospitantInnen / GastwissenschaftlerInnen / StudentInnen/ Azubis

Iryna Hruschetska
Emad Karimi
Philipp Schmidt

Doktorandinnen

Duygu Emirhar
Carolyn Kästner
Keike Schwartz
Kaya Stollberg