

Virusjagd – Damals und heute



Timm Harder, Martin Beer

Institut für Virusdiagnostik
Friedrich-Loeffler-Institut
Insel Riems

Pathogene Erreger des Menschen

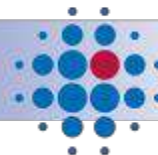
- **60% sind zoonotischen Ursprungs**
(Wiederkäuer, Fleischfresser, Vögel, Primaten)
- **15% werden als „emerging“ bewertet**
(davon > 70% zoonotisch)
- **25% ebenfalls in Haus- und Wildtieren**

Woolhouse and Gowtage, 2005

„Zoonoses from wildlife represent the most significant, growing threat to global health of all EID.“

Jones et al., 2008

1910-2010



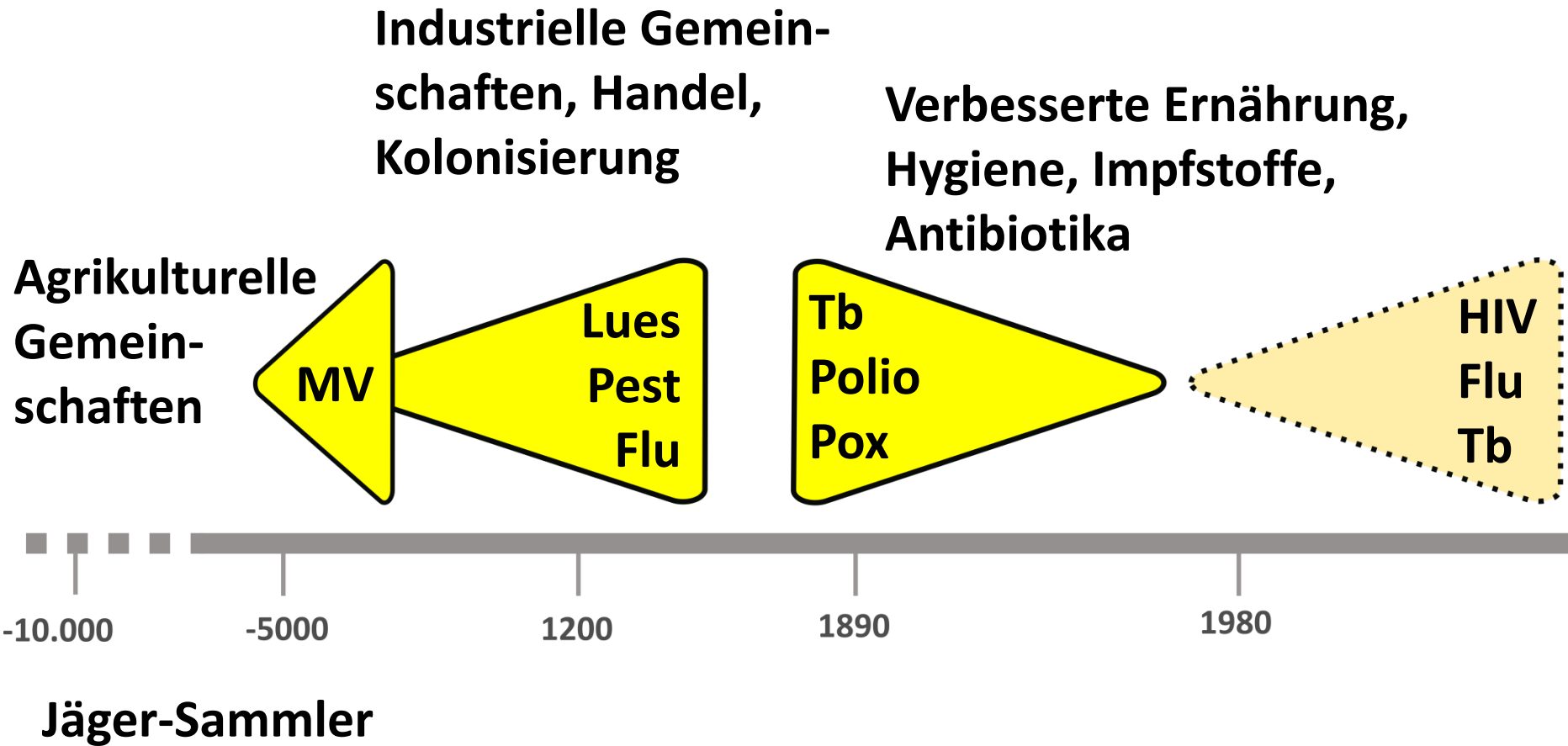
FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

100 JAHRE

FLI

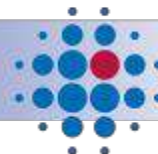
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Belastungen durch Infektionskrankheiten



Jones et al., 2013

1910 - 2010



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

100 JAHRE

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

“A minimum of 320,000 mammalian viruses awaiting discovery”

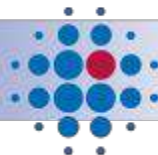
A Strategy To Estimate Unknown Viral Diversity in Mammals

Simon J. Anthony,^{a,b} Jonathan H. Epstein,^b Kris A. Murray,^b Isamara Navarrete-Macias,^a Carlos M. Zambrana-Torrel,^b Alexander Solovyov,^a Rafael Ojeda-Flores,^c Nicole C. Arrigo,^a Ariful Islam,^b Shahneaz Ali Khan,^d Parvies Hosseini,^b Tiffany L. Bogich,^{e,f} Kevin J. Olival,^b Maria D. Sanchez-Leon,^{a,b} William B. Karesh,^b Tracey Goldstein,^g Stephen P. Luby,^h Stephen S. Morse,^{g,i} Jonna A. K. Mazet,^g Peter Daszak,^b W. Ian Lipkin^a

Mbio, 2013, 4: e00598-13

- “Virome” aller Wildtierarten?
- Detektion mit degenerierten Primern (PCR, Chips)
- Detektion mittels Metagenomanalyse
- Sind ca. 10 Milliarden US \$ ausreichend?
- Was ist das zoonotische Potenzial all dieser Viren?

1910 – 2010



100 JAHRE

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health



Achtung, Seuchenschwelle! Bevor die junge Assistentin das „Sperrgebiet des Sperrgebiets“ betritt, muß auch sie, wie alle Mitarbeiter, Kleidung und bereitgestellte Schutzpantoffeln wechseln. Die Tür trennt den virusfreien Teil des Instituts von jenen Räumen, in denen 12 Veterinär-

Mediziner und Chemiker mit Erregern gefährlichster Tierkrankheiten laborieren und Impfstoffe erarbeiten. Die auf einer Insel des Greifswalder Boddens gelegene Forschungsstätte besitzt große Bedeutung für eine erfolgreiche Entfaltung der Viehwirtschaft in der Deutschen Demokratischen Republik

Die Virusjäger von Riems

Unser Reporter G. Kiesling besuchte die von aller Welt abgeschlossene Herstellungsstätte für Impfstoffe gegen Tierseuchen

Kühe fahren Seilbahn: Nachschub für Rinder, die bereits ihre Pflicht bei der Erzeugung von Impfstoffen gegen Maul- und Klauenseuche erfüllt haben. Das weltbekannte Institut stellt ferner Heilstoffe gegen Rotlauf, Staube und Hühnerpest her

Auf der Schlachtbank? Noch nicht, die Kuh erhält zunächst eine Spritze mit Krankheitsregern. Nach 24 Stunden ist sie „durchseucht“, ihre Zungenschleimhaut ergibt den Impfstoff. Das Fleisch des später geschlachteten Tieres bleibt genießbar

„Schlachtbank“ der Zukunft: Die Virusjäger von Riems versuchen jetzt, die Grundlage für Impfstoff gegen Maul- und Klauenseuche aus angebrüteten und infizierten Eiern zu gewinnen: eine bedeutende Vereinfachung und Voreinfachung

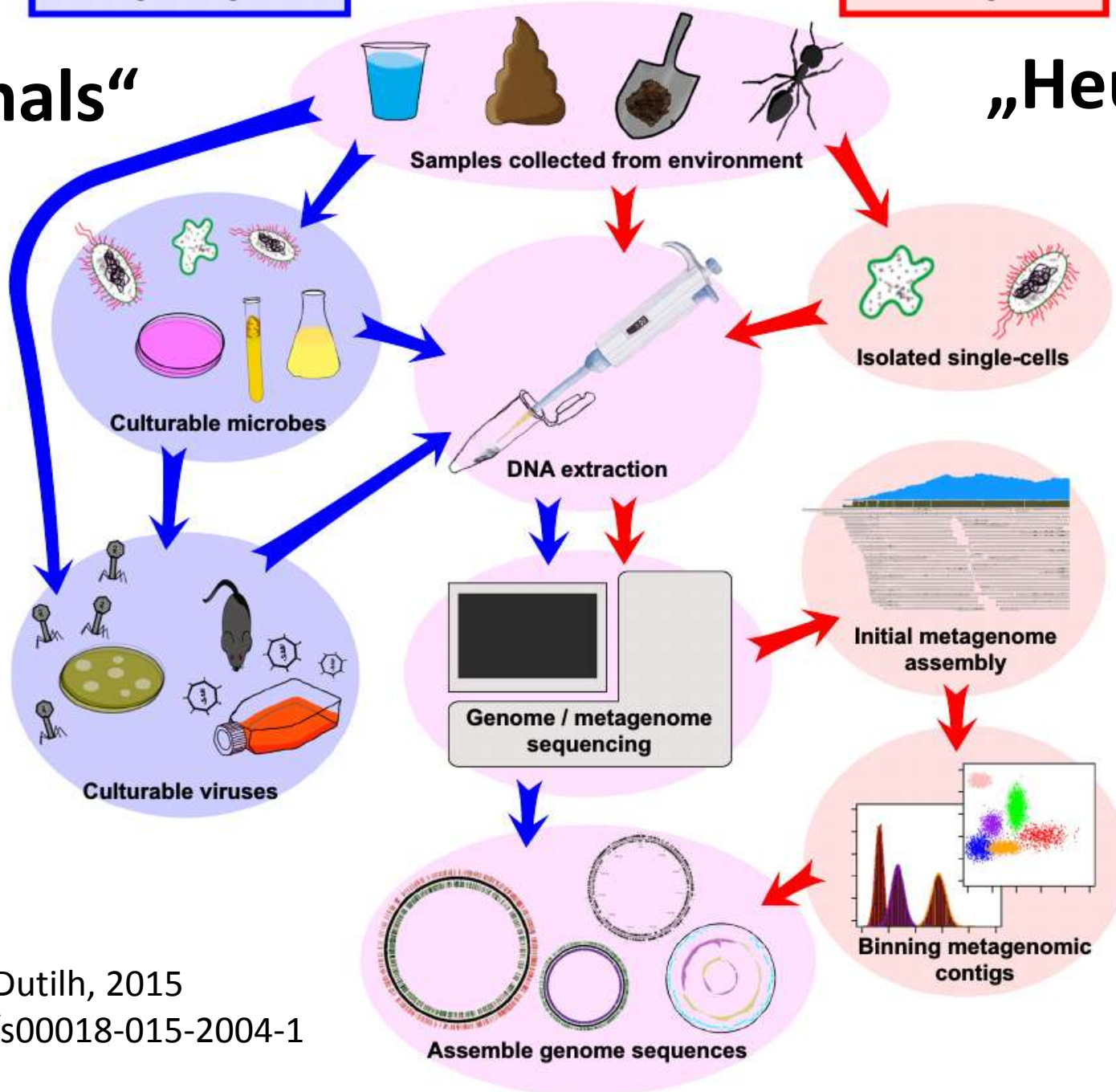


Culturing-based genomics

Uncultured genomics

„Damals“

„Heute“

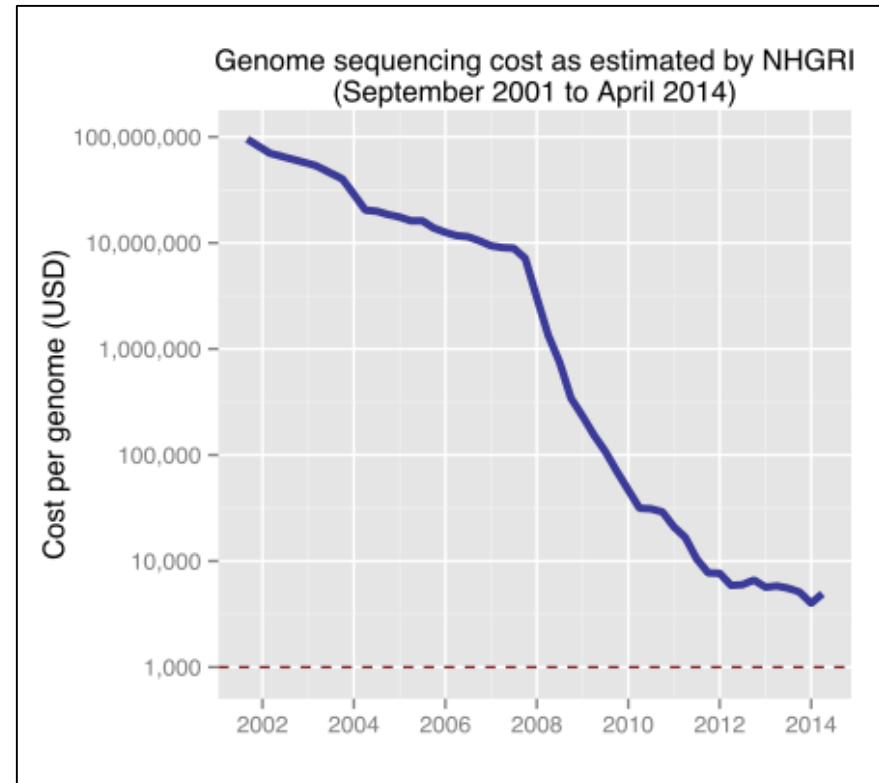


Garza & Dutilh, 2015

10.1007/s00018-015-2004-1

NGS-Technology

- Verschiedene Plattformen
- Enormes Potential: Milliarden Nukleotide/Ansatz werden sequenziert
- Molekulare Analyse ganzer Genome (whole genome; WGA), Populationen und Mikroökosysteme
- **NGS ermöglicht Metagenomics**



NGS-Genomsequenzierung ≠ Metagenom-Analyse!

Hostspecies	Matrix	Sequencing platform	Reads	Pathogen-Reads	% Pathogen-Read	Pathogen
Sheep	Vaccine	454	130302	4188	3,214	Poxviridae
				26	0,020	Herpesviridae
				149	0,114	Canine distemper virus
Sn					8,917	Nidovirus
Sn					1,302	Retrovirus
					0,004	Nidovirus
Go					0,013	BTV-27
Go					5,082	BTV-y
Go					12,790	BTV-z
Sq					0,000	Bornavirus
Ca					0,026	Schmallenbergvirus
Tu					37,802	Cardiopicornavirus
Turtle	Cell culture supernatant	illumina MiSeq	91570	74949	81,849	Cardiopicornavirus
Turtle	Cell culture supernatant	illumina MiSeq	142879	36350	25,441	Cardiopicornavirus
Turtle	Cell culture supernatant	illumina MiSeq	36419	32131	88,226	Orthoreo
Lynx	Cell culture supernatant	illumina MiSeq	61953	16110	26,004	Calicivirus
Pig	Cell culture supernatant	illumina MiSeq	3148090	2149161	68,269	porcine Astrovirus
Cattle	Cell culture supernatant	illumina MiSeq	2008444	1862	0,093	bovine Astrovirus
Penguin	Cell culture supernatant	Ion Torrent	1388762	9992	0,719	Herpesvirus
		illumina MiSeq	902219	10229	1,134	Herpesvirus
Penguin	Cell culture supernatant	Ion Torrent	970744	6022	0,620	Herpesvirus
		illumina MiSeq	750535	4548	0,606	Herpesvirus
Trout	Cell culture supernatant	454	130100	141	0,108	Paramyxovirus
Fish	Cell culture supernatant	illumina MiSeq	361380	288129	79,730	Orthomyxovirus
Pig				260000	84,692	Mycoplasma
Dog				86	0,014	Plasmodium
				19	0,003	Leishmania
Dog				11	0,001	Plasmodium
				4	0,000	Leishmania
Dog				150	0,015	Plasmodium
				59	0,006	Leishmania
Dog				4	0,015	Plasmodium
				2	0,007	Leishmania
Pig	Feces	illumina MiSeq	1000000	10376	1,038	Porcine epidemic diarrhea virus

Complete Coding Genome Sequence of Putative Novel Bluetongue Virus Serotype 27

Maria Jenckel,^a Emmanuel Bréard,^b Claudia Schulz,^a Corinne Sailleau,^b Cyril Viarouge,^b Bernd Hoffmann,^a Dirk Höper,^a Martin Beer,^a Stéphan Zientara^b
 Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany^a; ANSES Alfort, UMR 1161 ANSES/INRA/ENVA, Maisons-Alfort, France^b
 M.J. and E.B. contributed equally to this work.

Comparison of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses from Germany and the United States, 2014

Dennis Hanke,¹ Maria Jenckel,¹ Anja Petrov, and their relation to the outbreak strain in the United States is lacking.
 Mathias Ritzmann, Julia Stadler, We report a case of PED that occurred on a swine-fattening farm in Germany in May 2014. The causative
 Valerij Akimkin, Sandra Blome, Anne Pohlmann, Horst Schirrmeyer, Martin Beer, Dirk Höper

Was ist Metagenom-Analyse?

The basic definition of metagenomics is the analysis of genomic DNA from a whole community.

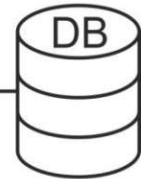
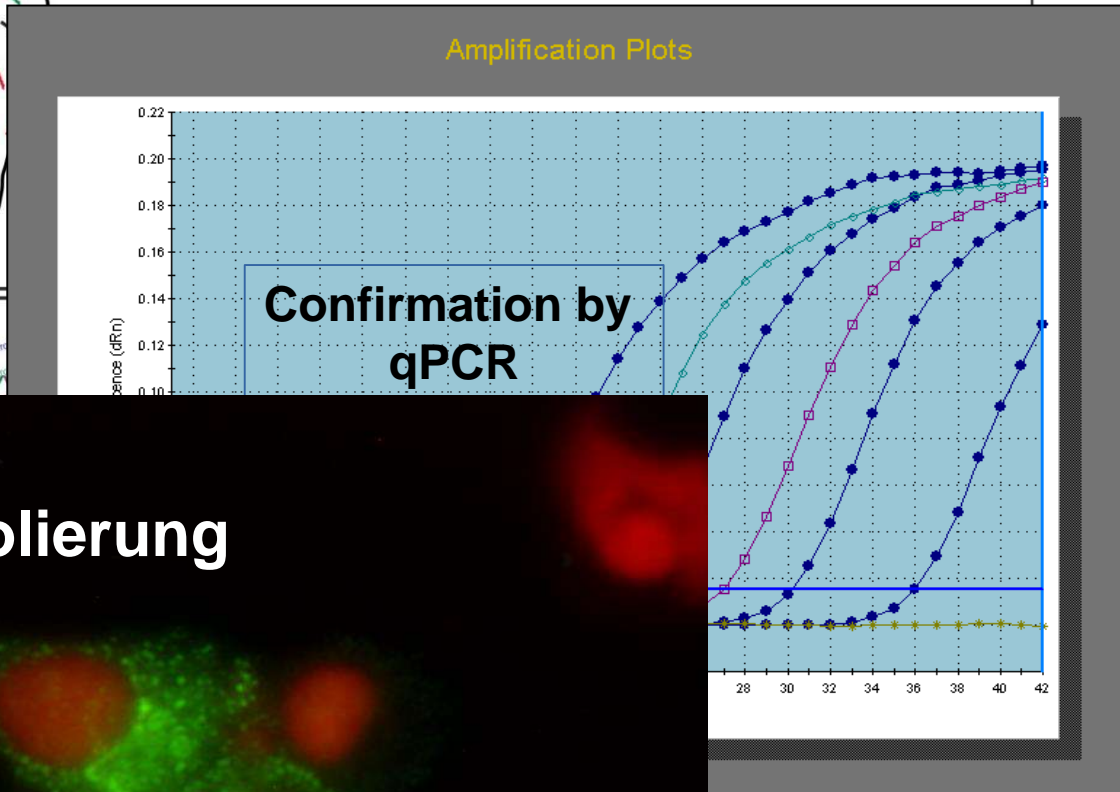
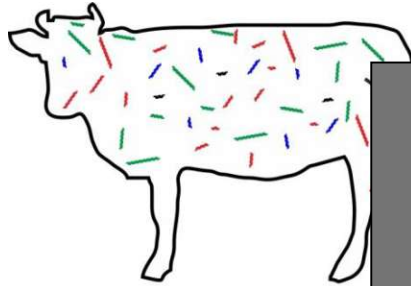
Gilbert JA, Dupont CL (2011). *Ann Rev Mar Sci* 3: 347-71

Metagenomics is the application of **modern genomics techniques** to the study of communities of microbial organisms directly in their natural environments, **bypassing the need for isolation and lab cultivation** of individual species.

Chen K, Pachter L (2005). *PLoS Comput Biol* 1(2): e24.

Metagenomics Workflow

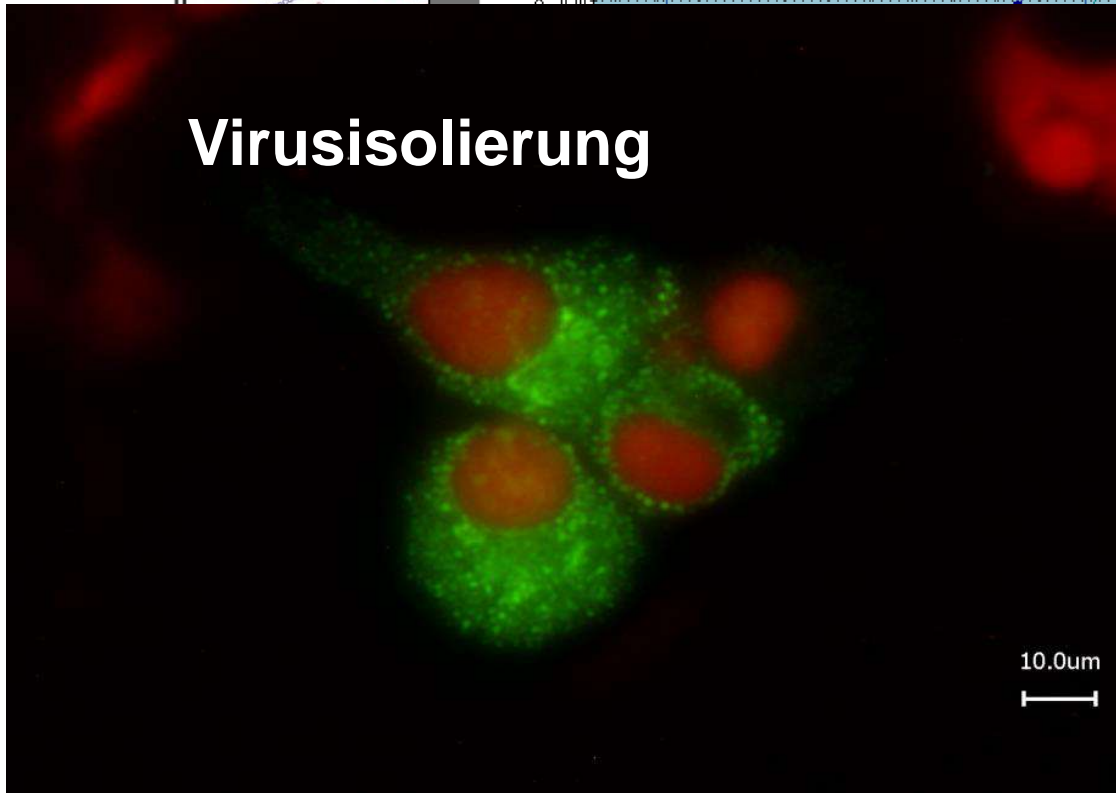
Probe !



Organism 1

Organism 2

Virusisolierung



Datenanalyse!

Probleme der Metagenom-Analyse

„Pathogen detection in a metagenomic dataset is finding the needle in a haystack“



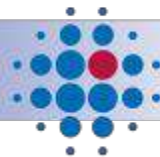
- Nachweis einer „bekannten“ Nadel?
- Sind es unbekannte Erreger, die jedoch verwandte Sequenz-einträge in Datenbanken haben?
- Sind es unbekannte Sequenzen ohne Verwandte in Datenbanken?
- **Hoher manueller Aufwand (und „gut feeling“) bei der Auswertung erforderlich!**

Probleme der Metagenom-Analyse

„Pathogen detection in a metagenomic dataset is finding the needle in a **needlestack**“



1910 - 2010



100 JAHRE

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Probleme der Metagenom-Analyse

„Pathogen detection in a metagenomic dataset is finding the **one needle** in a **needlestack** that **is different** from another needlestack. “

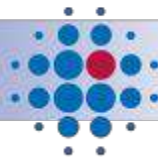


Gesundes Tier/Bestand



Krankes Tier/Bestand

1910 - 2010



100 JAHRE

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

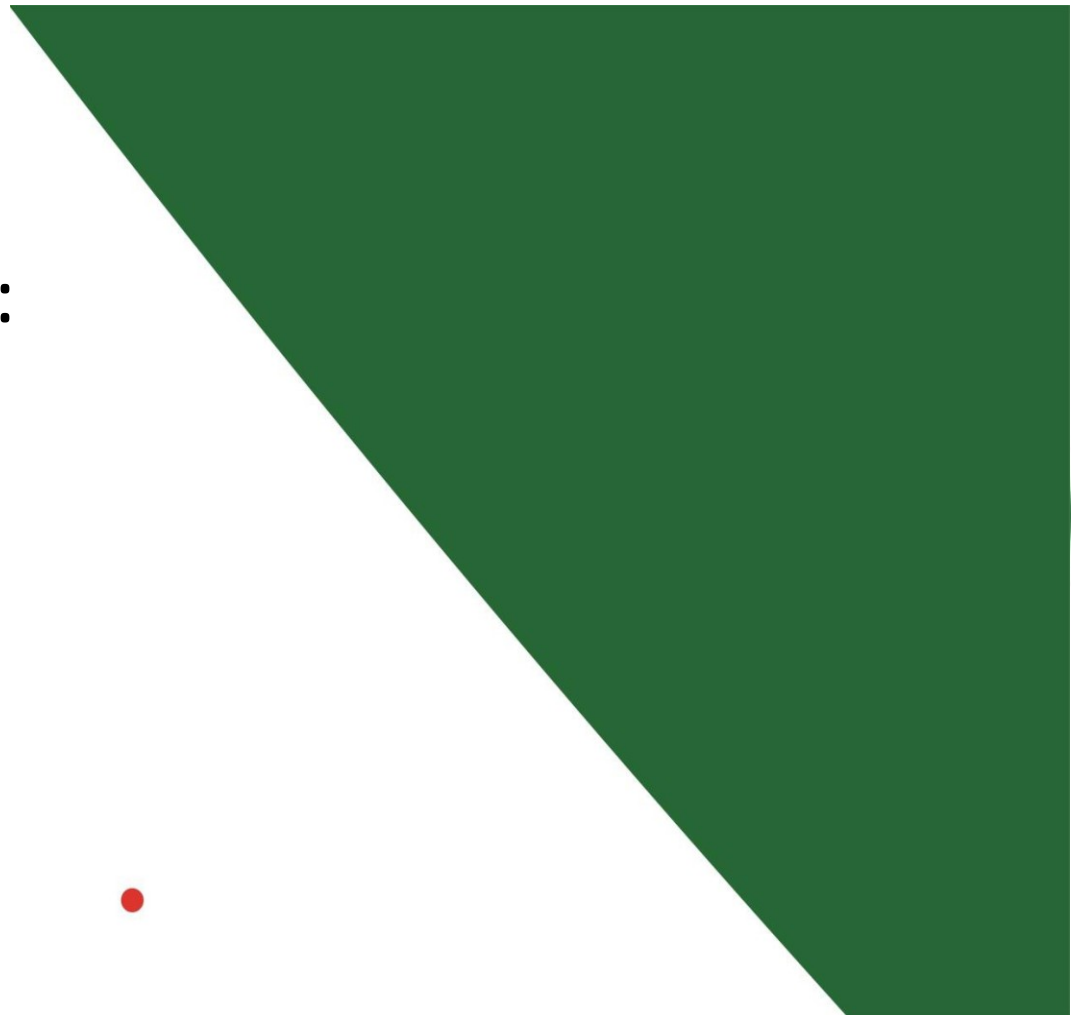
FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

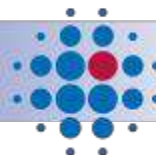
Gaaanz viel Tier, viel Bakterien, gaaanz wenig Virus!

- **Rindergenom:**
2.97 Gbp
- **Circovirusgenom:**
1768 b

→ Massenverhältnis
CV:Cattle = 1:1,679,864



1910-2010



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

100 JAHRE

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Datenanalyse – ein Nadelöhr

- Große Datenbanken: Lange Rechenzeiten für Abgleiche (Monate!)
- **Zu kleine Datenbanken: Wichtige Sequenzen eventuell nicht repräsentiert?**

Scheuch et al. *BMC Bioinformatics* (2015) 16:69
DOI 10.1186/s12859-015-0503-6



Reliable Information Extraction from Metagenomic Sequence datasets

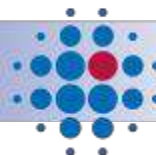
METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

RIEMS: a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomics datasets

Matthias Scheuch[†], Dirk Höper^{*†} and Martin Beer

1910 – 2010

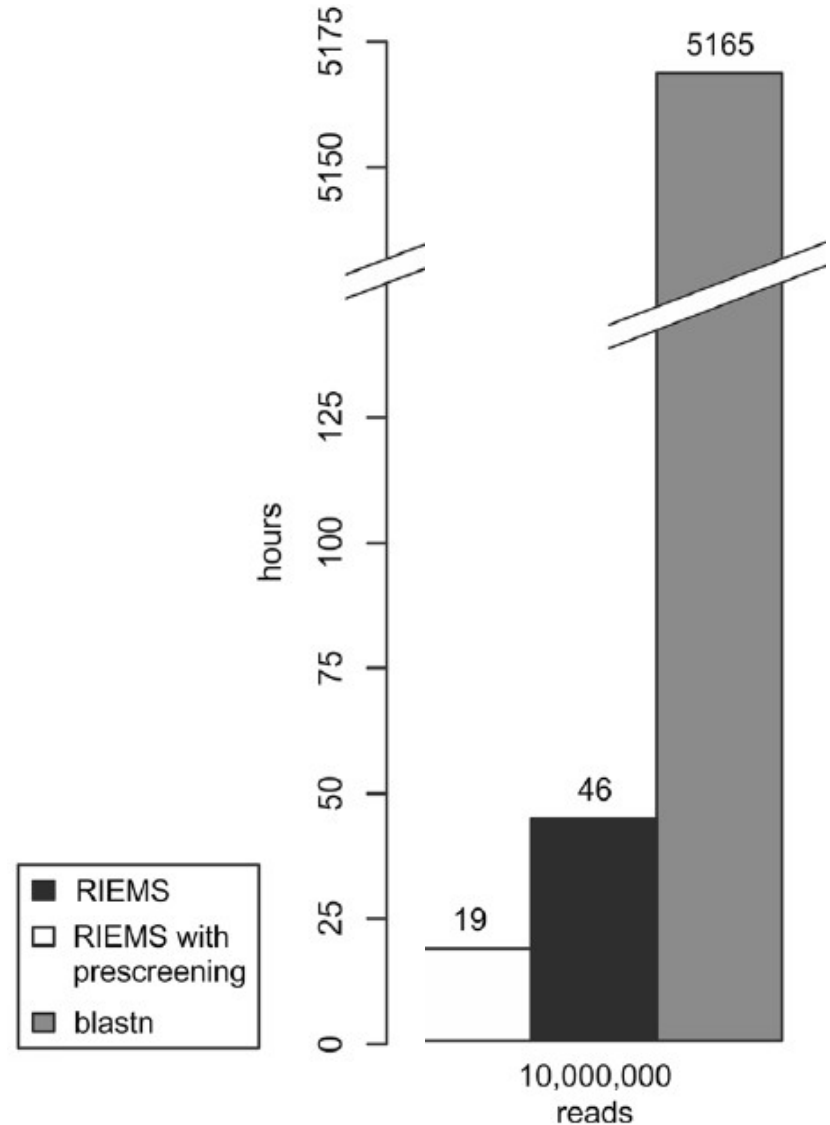
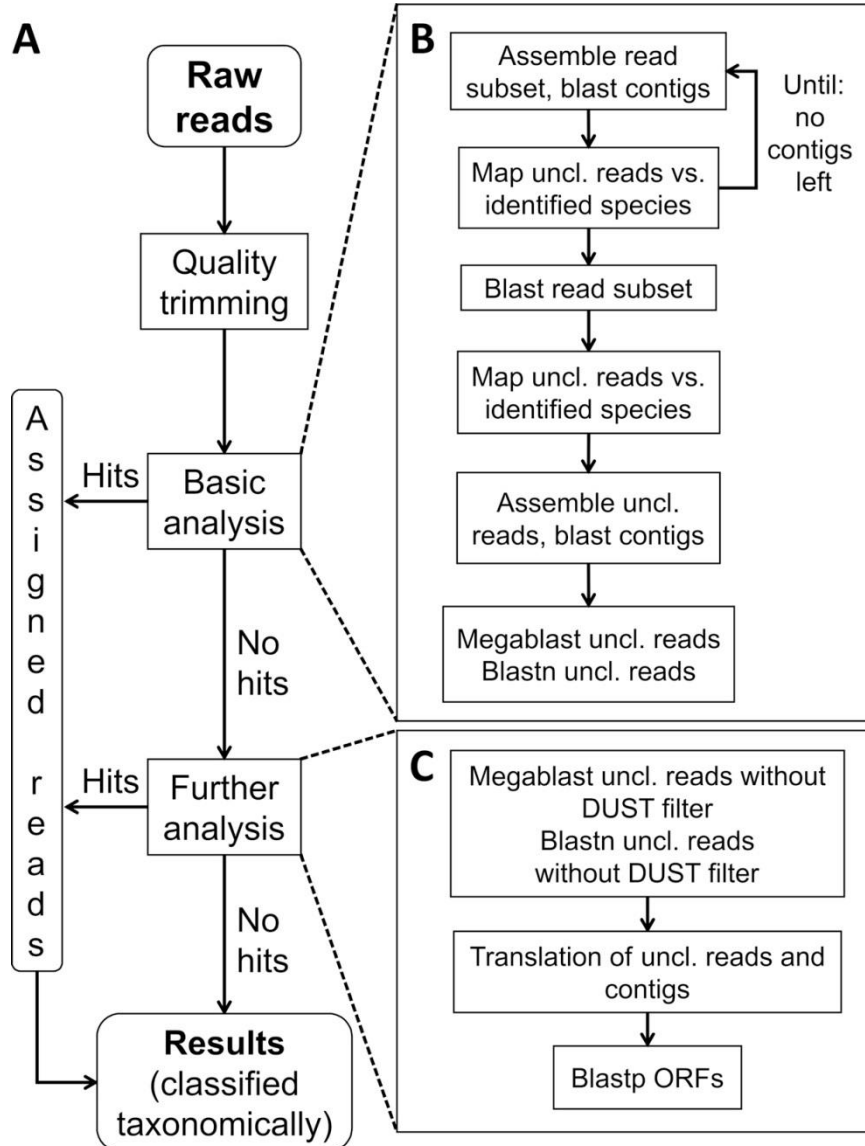


100 JAHRE

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health



Beispiel 1: SBV



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

since 1910

FLI

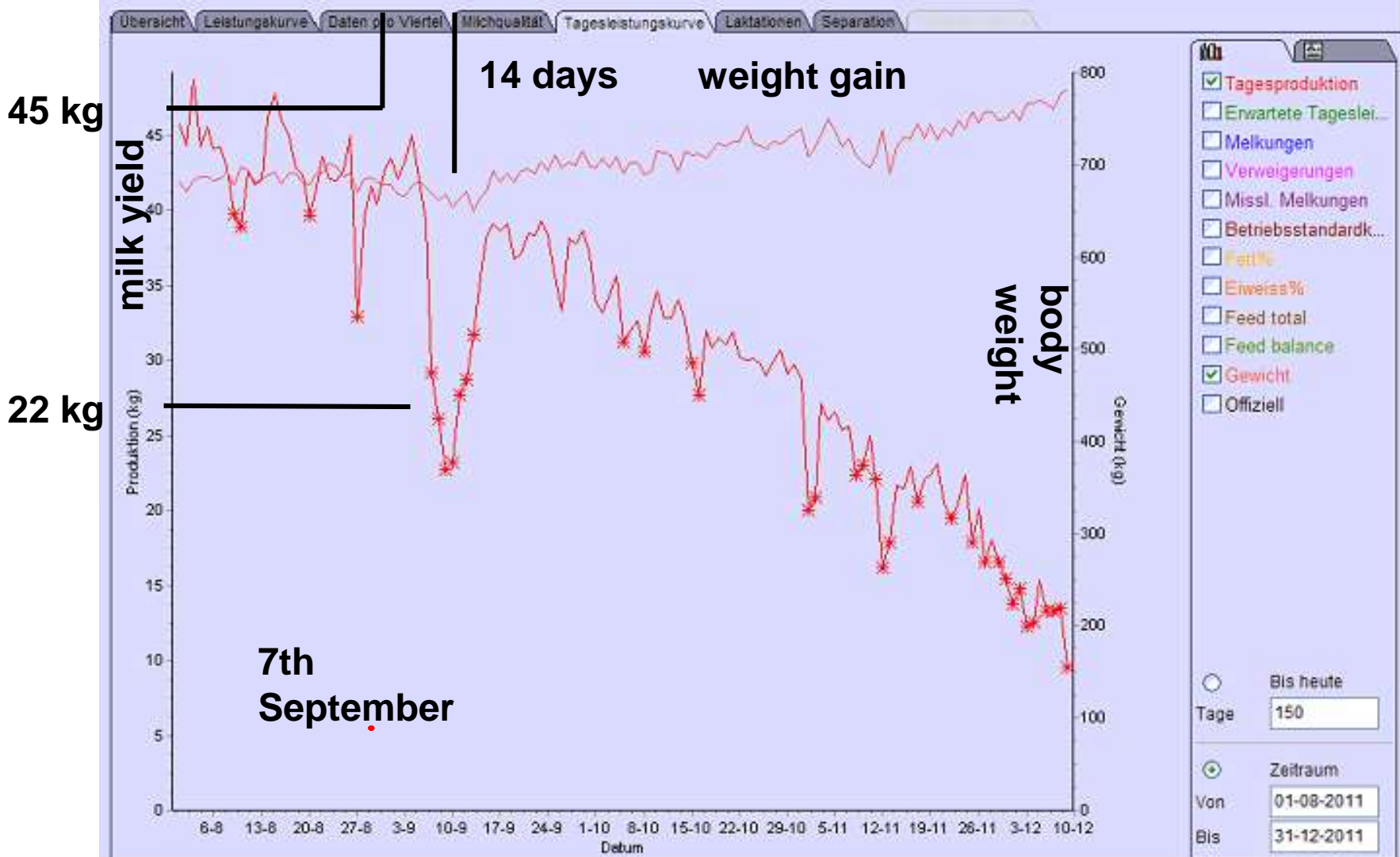
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health





Kuh 441; 213 Tage in Laktation (Hof 1)

Tagesleistung von '441 Ernett'





Superkingdom Tax-ID

Family Tax-ID

Taxonomy-ID count Scientific name

Mapping Assembly Blastn vs orgs. Megablast vs ntodb Blastn vs ntodb

	1	377	root					
NA		377						
	155900	1	uncultured organism	0	0	0	1	0
	2592	1	Plasmid pLB1	0	0	0	0	1
	32630	365	synthetic construct	148	0	217	0	0
	521732	10	Cloning vector lambdaS2775	0	8	0	2	0

Superkingdom Tax-ID

Family Tax-ID

Taxonomy-ID count Scientific name

Mapping Assembly Blastn vs orgs. Megablast vs ntodb Blastn vs ntodb

	11571	7	Bunyaviridae					
	11582	2	Aino virus	0	0	0	0	2
	159150	1	Shamonda virus	0	0	0	1	0
	70566	4	Akabane virus	0	0	0	0	4

	280701	1	Pseudomonas phage F116	0	0	0	1	0
	11571	7	Bunyaviridae					
	11582	2	Aino virus	0	0	0	0	2
	159150	1	Shamonda virus	0	0	0	1	0
	70566	4	Akabane virus	0	0	0	0	4
	11632	16	Retroviridae					
	11864	4	Avian leukosis virus	0	0	0	3	1
	269448	1	Rous sarcoma virus - Schmidt-Ruppin D	0	0	0	1	0
	31670	12	Avian myeloblastosis-associated virus type 2	0	6	0	6	0
	151340	2	Papillomaviridae					
	10579	2	Human papillomavirus type 8	0	0	0	2	0
	2	13363	Bacteria					
	103957	2	Actinosynnemataceae					
	446462	2	Actinosynnema mirum DSM 43827	0	0	0	2	0



Centers for Disease Control and Prevention

CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People™

Emerging Infectious Disease journal ISSN: 1080-6059

Volume 21, Number 7—July 2015

Dispatch

Schmallenberg Virus Recurrence, Germany, 2014

On This Page

Kerstin Wernike, Bernd Hoffmann, Franz J. Conraths, and Martin Beer✉

Author affiliations: Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Germany

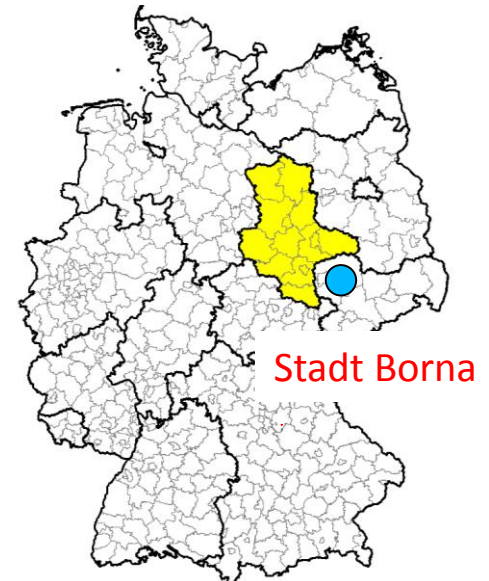


Beispiel 2: Neues zoonotisches Bornavirus (VSBV-1)



Wie alles begann:

- Drei Fälle tödlicher Enzephalitis by Züchtern von Bunthörnchen in Sachsen-Anhalt (2011, 2013)
- Bunthörnchen (*Sciurus variegatoides*), stammten aus Zentralamerika, wurden als Haustiere nach Deutschland importiert
- Klinik, pathologisch-anatomische und histopathologische Veränderungen im Einklang mit dem Bild einer viralen Enzephalitis
- Bunthörnchen als einziger gemeinsamer anamestischer Faktor: Zoonotische Herkunft des Erregers ?





Einzelnes Hörnchen aus Haltung von Patient 3 beprobt:

- Alle Routineuntersuchungen (Viren, Bakterien, Parasiten) negativ.
- Metagenom-Analyse initiiert:

Table S5: Results of the metagenomic analyses of variegated squirrel contact animal samples

Sample	Organ	Reads sequenced	BoDV-related reads	Nucleotide sequence identity with BoDV
L00652	Kidney/liver/lung	376,229	3	70.3 - 81.2 %
L00651	Chest cavity fluid	40,499	2	75.5 - 80.6 %
L00653	Heart/brain	410,648	7	67.6 - 81.7 %
L00647	Intestine	63,346	0	NA
L00650	Spleen	370,041	0	NA
L00648	Oropharyngeal swab	16,491,045	16	70.4 - 81.7 %

NA, not applicable

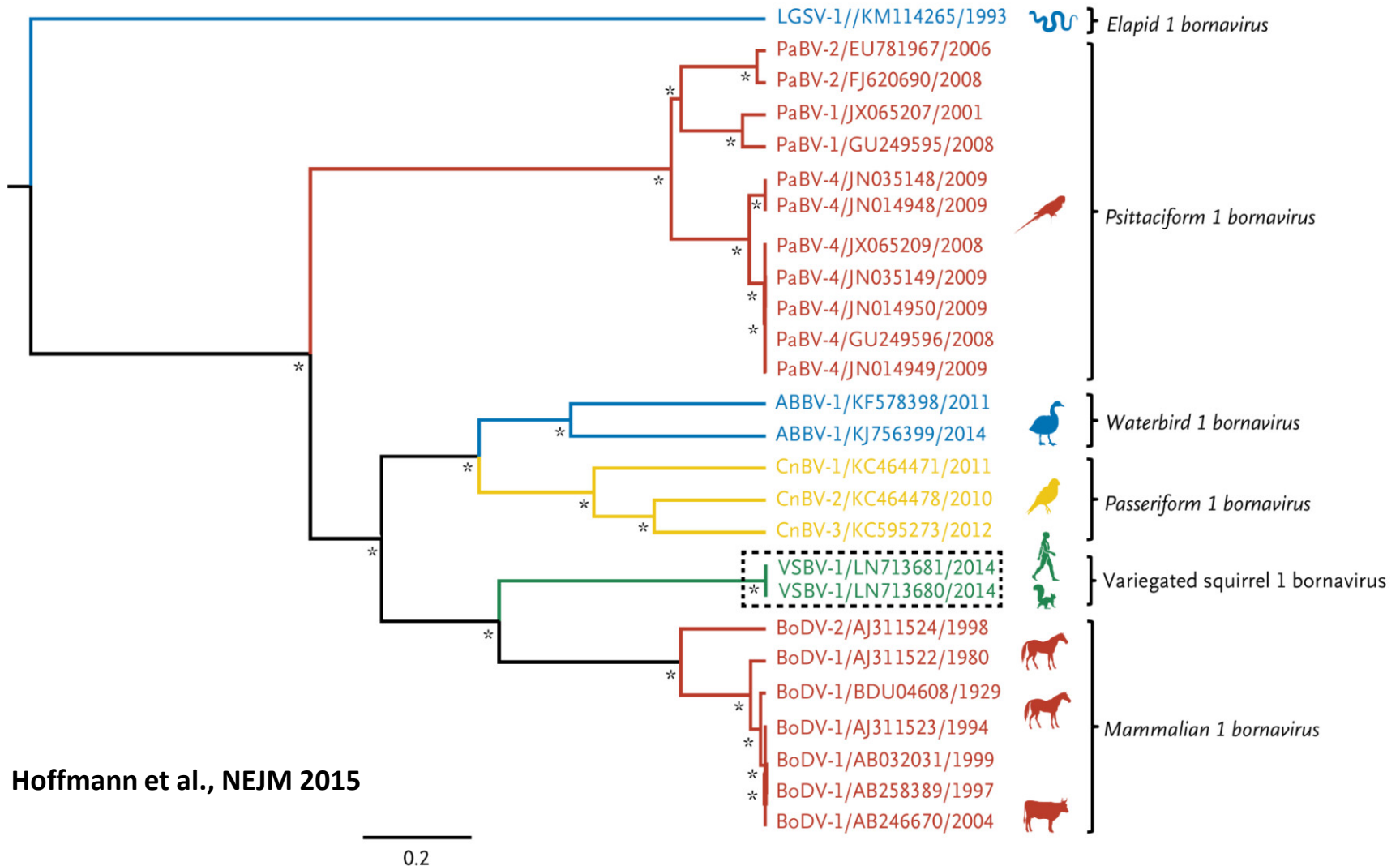
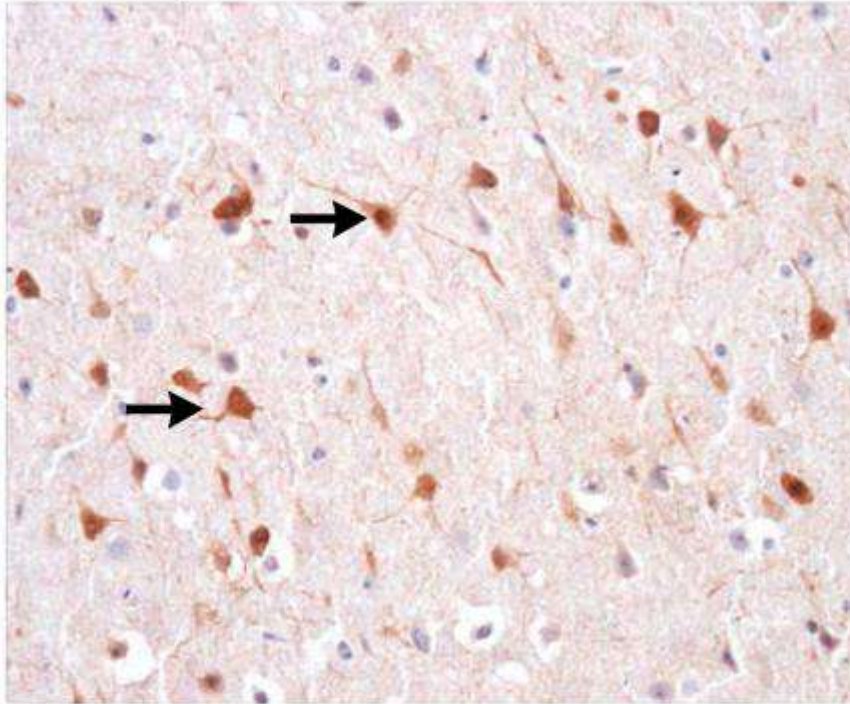
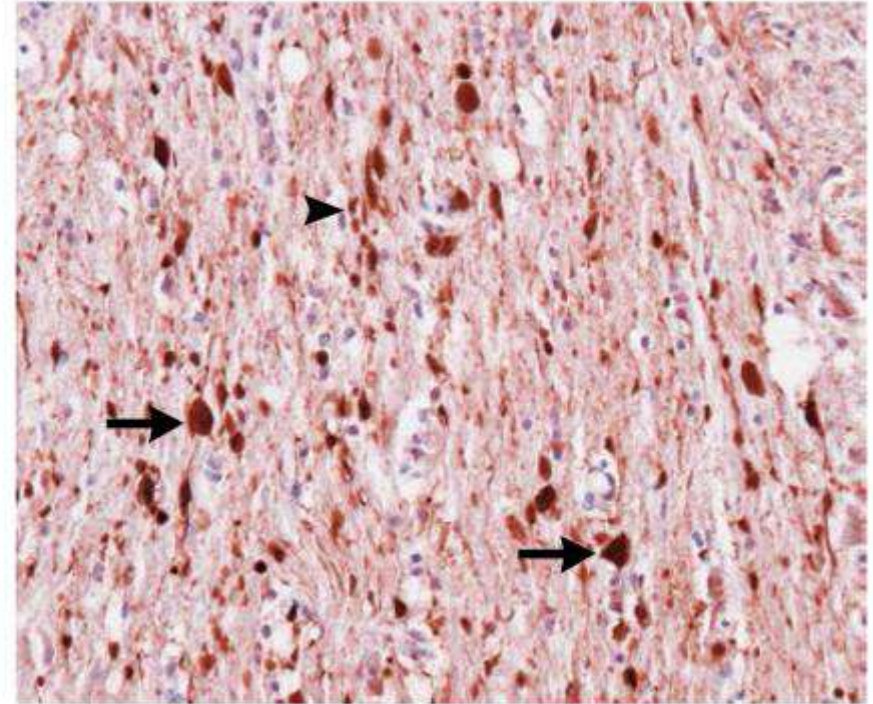


Figure 2. Phylogenetic Analysis of the Members of the Bornavirus Genus, Including the Putative Variegated Squirrel 1 Bornavirus (VSBV-1) Species.

A X protein, squirrel



B X protein, Patient 1

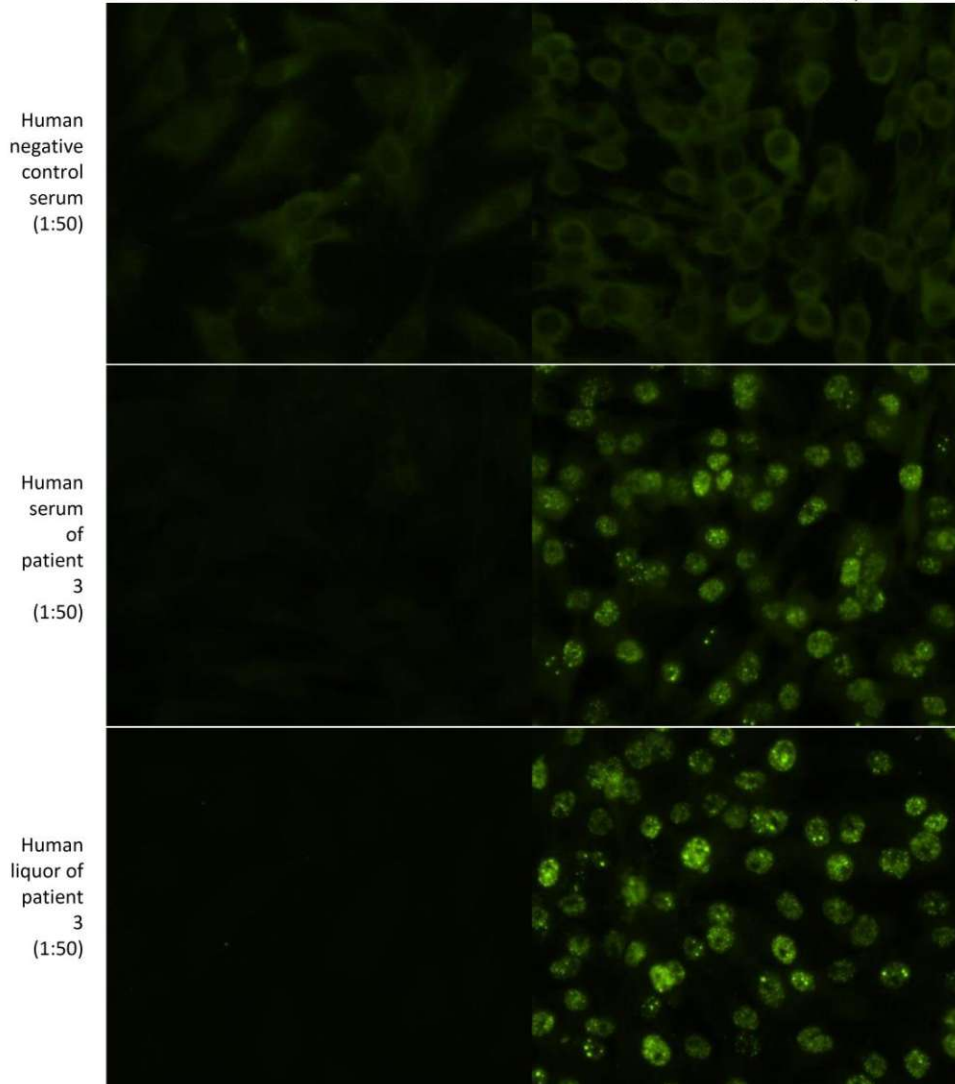


Immunohistochemischer Nachweis von VSBV Antigen im ZNS (gesunder) Hörnchen und des Patienten 1.

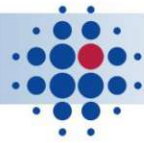
Figure S4:

cell line CRFK 769
(non-infected)

cell line CRFK 227
(persistently infected with
mammalian 1 bornavirus)



- Seropositive Reaktionen mit Serum und Liquor von Patient #3 gegenüber BoDV-infizierter Zellkultur
- Bestätigung durch Uni Giessen (Tierärztliche Fakultät) mit akkreditierter serologischer Methodik.



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

BRIEF REPORT

A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis

Bernd Hoffmann, D.V.M., Dennis Tappe, M.D., Dirk Höper, M.Sc.,
Christiane Herden, D.V.M., Annemarie Boldt, M.D., Christian Mawrin, M.D.,
Olaf Niederstraßer, M.D., Tobias Müller, M.D., Maria Jenckel, M.Sc.,
Elisabeth van der Grinten, D.V.M., Christian Lutter, D.V.M.,
Björn Abendroth, M.Sc., Jens P. Teifke, D.V.M., Daniel Cadar, D.V.M., Ph.D.,
Jonas Schmidt-Chanasit, M.D., Rainer G. Ulrich, Ph.D., and Martin Beer, D.V.M.



Weitere Beispiele ...

Journal of General Virology (2015), 96, 2994–2998

DOI 10.1099/jgv.0.000251

Short Communication

Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA

Ben M. Hause,^{1,2} Emily A. Collin,^{1,2} Lalitha Peddireddi,^{1,2}
Fangfeng Yuan,² Zhenhai Chen,² Richard A. Hesse,^{1,2} Phillip C. Gauger,³
Travis Clement,⁴ Ying Fang² and Gary Anderson^{1,2}

Correspondence

Ben M. Hause
bhause@vet.k-state.edu

¹Kansas State Veterinary Diagnostic Laboratory, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA

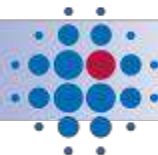
²Department of Diagnostic Medicine and Pathobiology, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA

³Department of Veterinary Diagnostic and Population Animal Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, USA

⁴Animal Disease Research and Diagnostic Laboratory, South Dakota State University, Brookings, SD, USA

Schlussfolgerungen

- Metagenom-Analyse ist ein universelles und machtvolles Werkzeug zur Entdeckung unerwarteter und unbekannter Erreger
- Schlüssel zum Erfolg ist die Abundanz des Erregers im Metagenom der untersuchten Probe
- Strategische Planung der Probenauswahl und –vorbereitung erforderlich
- Optimierte Datenaufbereitung und -analyse sowie geeignete Datenbanken sind unverzichtbar

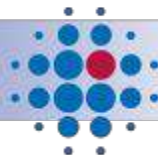


Verringerung der **Biodiversität** (Wildtiere) und der **genetischen Vielfalt** (Nutztiere)

- Hohe Biodiversität bedingt einen Verdünnungseffekt von Pathogenen
- Geringe Biodiversität begünstigt wenige Arten/Vektoren und bedingt u.U. höhere Pathogenprävalenzen
- Geringe genetische Vielfalt erhöht das Risiko für “uniforme“ Pathogenesen

Roche & Guegan, 2011

1910 - 2010



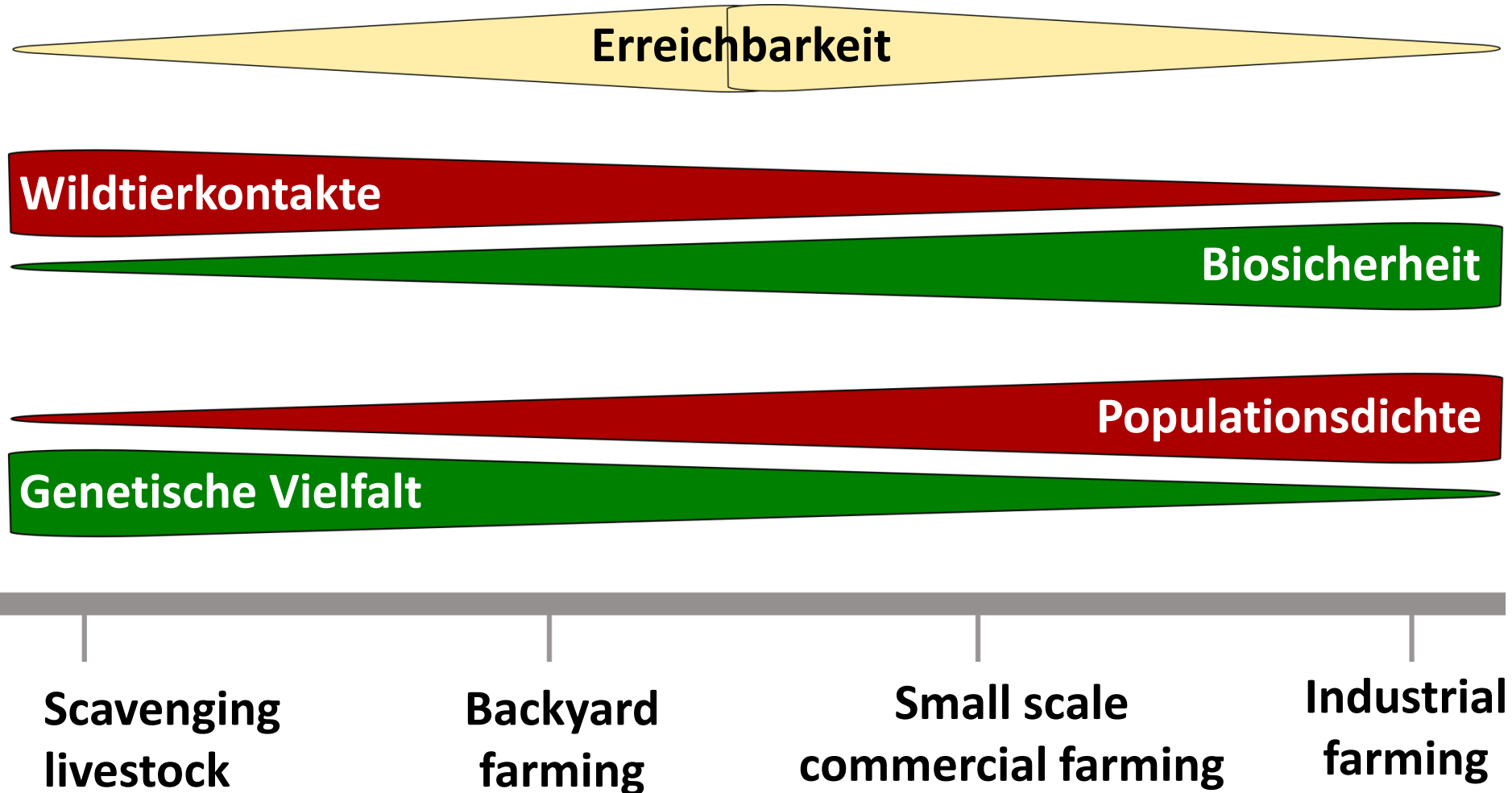
100 JAHRE

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

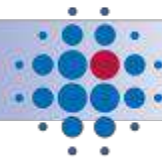
FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Vielfalt versus Masse



1910 - 2010



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

100 JAHRE

FLI

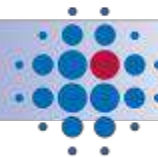
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

OneHealth –

Vergangenheit und Zukunft der Infektiologie



1910 – 2010



100 JAHRE

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health



Blaise Pascal, 1623-1662

**Des Menschen
ganzes Unglück
kommt von seinem
Unvermögen, alleine
in einem stillen
Raum sitzen zu
können.**

Herzlichen Dank für ihre Aufmerksamkeit!



Medienquellen auf Anfrage vom Vortragenden erhältlich.

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT |

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health