

Sachbericht zum Verwendungsnachweis/Gesamtausgabennachweis

Allgemeine Angaben zum Vorhaben

Förderkennzeichen:	2817LEAP01
Zuwendungsempfänger:	Universität Hohenheim, Fachgebiet Infektions- und Umwelthygiene bei Nutztieren, PD Dr. Wolfgang Beyer
Vorhabenbezeichnung:	Multisektorale Strategie zur Bekämpfung der Brucellose in Ostafrika
Laufzeit des Vorhabens (Berichtszeitraum):	August 2018 - Dezember 2021
Kooperierende Partner:	<ul style="list-style-type: none"> • Prof Dr Joseph Erume, Makerere University, Kampala, Uganda • PD Dr. Wolfgang Beyer, Universität Hohenheim, Stuttgart • Prof Dr Ignacio Moriyon, University of Navarra, Pamplona, Spanien • Prof Dr Jose Blasco, Centro de Investigacion y Technologica Alimentaria de Aragon, Zaragoza, Spanien • Prof Dr Lilly Beboru, Faculty of Veterinary Medicine University of Nairobi, Kenia
Assoziierte Partner:	<ul style="list-style-type: none"> • Animal Health Research Institute (AHRI), Mansoura, Ägypten • Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, Ägypten
Weitere Kooperationspartner	<ul style="list-style-type: none"> • Friedrich-Löffler-Institut, Jena • Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Berlin

Bitte fügen Sie eine Karte der Zielregion ein:



Abb. 1: Probenursprungsgebiet Ägypten (Karte entnommen aus: Holzer et al. (2021), Microorganisms, 9, 1942.

1. Gegenstand und Ziele des Vorhabens

1.1. Bitte erläutern Sie Gegenstand und Ziele des Vorhabens (mit Bezug zu den Zielen der konkreten Bekanntmachung oder Ausschreibung).

Die Viehzucht in vielen afrikanischen Ländern, so auch in Ägypten, stellt einen sehr hohen wirtschaftlichen Faktor dar und hat große Bedeutung für die Ernährung und Gesundheit in diesen Ländern.

Für Uganda und Kenia bedroht die Krankheit die Population von ca. 30,4 Mio. Rindern, 42,4 Mio. Ziegen, 21,1 Mio. Schafen und 5,3 Mio. Schweinen. Die Tierhaltung erfolgt mehrheitlich in Kleinbetrieben und Weidehaltung. Dabei ist die gemischte Haltung verschiedener Tierarten die Regel. Die Nutztierhaltung ist zentral für die Nahrungsmittelversorgung der Bevölkerung in diesen Ländern und sichert 70-80 % der Bevölkerung ein Einkommen. Entsprechend hoch ist der Impact von Tierseuchen wie der Brucellose auf Nahrungsmittelsicherheit, die sozio-ökonomische Entwicklung und die Gesundheit der Bevölkerungen (Ducrotoy et al., 2017).

Trotz Nachweis einer hohen Prävalenz der Brucellose in den Nutztierbeständen von Uganda und Kenia existieren dort derzeit keine staatlichen Kontrollprogramme. Ursachen dafür sind fehlende institutionelle und technische Voraussetzungen sowie eine unzureichende Aus- und Weiterbildung des für Bekämpfungsprogramme erforderlichen Personals in Landwirtschaft, Medizin und Veterinärmedizin. Dazu kommen eine gewisse auf traditionellen Eigenheiten beruhende Ignoranz und Fehlinformationen sowie staatliche Misswirtschaft.

In Kenia gelten bis zu 25 %, in Uganda bis zu 56 % und in Ägypten bis zu 38 % der Nutztiere als *Brucella*-infiziert. Daher wurde im ursprünglichen Programm angestrebt, Proben insbesondere aus diesen Ländern zu untersuchen.

Trotz Implementierung eines staatlichen Kontrollprogramms, 1981, ist die Brucellose auch in Ägypten noch immer endemisch und die Inzidenz steigt kontinuierlich, auch in der Humanpopulation. Sie liegt bei 64 bis 70 pro 100.000 Einwohnern.

Ziel des Projektes war die Erfassung der phylogeografischen Diversität und Verbreitung von *Brucella* spp. sowie die Ermittlung möglicher aktueller und historischer Verbreitungswege. Dabei sollte geprüft werden, inwieweit die Genotypisierung mit verschiedenen Methoden, MLVA und SNP-Analyse, die Quelle und Verbreitung von Ausbruchsstämmen nachvollziehbar macht. Diese Daten können die Grundlage für zielgerichtete Bekämpfungsstrategien in den Ländern bilden.

Für das Projekt MUSBCEA waren folgende Fragen von Bedeutung:

- 1) Wie hoch ist die Prävalenz der Brucellose in den Viehbeständen in Uganda, Kenia und Ägypten?
- 2) Was sind nachweisbare Verbreitungswege zwischen Viehbeständen und vom Tier zum Menschen?
- 3) Welche Ausbruchsstämme kommen vor und kann man deren Ausbreitung nachverfolgen (Biovar/Genotypen)?
- 4) Welche Vakzine versprechen nachhaltige Impferfolge?
- 5) Welche infrastrukturellen und Personalkapazitäten sind notwendig für das Brucellose-Management vor Ort, wie lassen sich diese bereitstellen und fokussieren?
- 6) Wie kann die Aufmerksamkeit der Bevölkerung, insbesondere der Viehhalter, erhöht werden?

Aufgabe des deutschen Projektpartners im Projektverbund war die Isolierung, Charakterisierung und Genotypisierung von *Brucella* spp. aus den Partnerländern. Unter Nutzung genetischer und epidemiologischer Metadaten sollten phylogeografische Karten zur Ver- und Ausbreitung von Brucellose-Ausbruchsstämmen in den Herkunftsländern erstellt werden. Die verwendeten Genotypisierungsmethoden folgten, wo möglich, einem hierarchischen Schema, unter Nutzung der canSNP-Analyse (für *B. melitensis*), der Fragmentanalyse (Bruce-ladder PCR, Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analyse (MLVA) und Gesamtgenomsequenzierung mit anschließender Coregenom-SNP (cgSNP)-Analyse. Die Sequenz- und MLVA-Daten sollten in die internationalen Datenbanken eingespeist und mit bereits existierenden Daten verglichen werden.

Literatur:

Ducrotoy M, Bertu WJ, Matope G, Cadmus S, Conde-Álvarez R, Gusi AM, Welburn S, Ocholi R, Blasco JM, Moriyón I (2017): Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Tropica* 165:179–193.

1.2. Benennen Sie den wissenschaftlichen und technischen Stand, an den zu Beginn des Projekts angeknüpft wurde.

Nach herkömmlichem Diagnose-Schema werden *Brucella* spp. aus klinischen Feldproben mittels einem selektiven Kulturmedium angezchtet und dann biochemisch charakterisiert.

Nach Präparation genomischer DNA kann die Spezies auch mittels einer diagnostischen Multiplex Bruce-ladder PCR (Lopez-Goni et al., 2008) bestimmt werden. Diese klassischen diagnostischen Methoden erlauben eine Differenzierung von *Brucella* Isolaten bis zum Biovar. Sie erlauben jedoch keine Differenzierung von Ausbruchsstämmen und sind damit für die Analyse von Ausbruchquellen und die Verbreitung von Ausbruchsstämmen ungeeignet.

In jüngerer Zeit haben sich die Methoden zur Analyse der Prävalenz und Diversität von *Brucella* spp., wie auch vielen anderen Krankheitserregern, von serologischen und laborkulturellen phänotypischen Methoden zu genotypischen Methoden der Differenzierung und Charakterisierung verschoben, wie z. B. der SNP-Analyse zur hochauflösenden Differenzierung von Genotypen (Janowitz et al., 2018) und deren phylogenetischen Verwandtschaft. Eine verbreitete Methode zur genotypischen Differenzierung ist die MLVA. Die molekulare Subtypisierung von *Brucella* mittels MLVA wurde mehrfach verbessert beschrieben (Al Dahouk et al., 2003; Le Fleche et al., 2006; Whatmore et al. 2006; Al Dahouk et al., 2007; Whatmore 2009, Maquart et al, 2009; Ferreira et al., 2012; Garafolo et al. 2013, Borrielo et al., 2013). Allerdings leiden die laborbasierten Techniken unter schlechter Wiederholbarkeit, einer beinahe unmöglichen Austauschbarkeit der Daten zwischen verschiedenen Laboratorien sowie dem Mangel an phylogenetischer Information. Trotz hoher diskriminatorischer Kapazität sind sie für die Definition von Ausbruchsstämmen und deren Verfolgung ungeeignet. Leider ist das in der bisherigen Literatur nicht ausreichend berücksichtigt. Das Projekt verfolgt daher nicht nur die Verbesserung der laborbasierten MLVA mittels einer in silico – Analyse der VNTR-Marker sondern auch den Vergleich der MLVA-Daten mit jenen aus der in silico Coregenom-SNP-Analyse.

Literatur:

1. Abdel-Hamid, N.H.; El-Bauomy, E.M.; Ghobashy, H.M.; Shehata, A.A. Genetic variation of *Brucella* isolates at strain level in Egypt. *Vet. Med. Sci.* **2020**, *6*, 421–432, doi:10.1002/vms3.260.

2. Al Dahouk S, Le Flèche P, Nöckler K, Jacques I, Grayon M, Scholz HC, Tomaso H, Vergnaud G, Neubauer H (2007): Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods*, 69:137-145.
3. Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., Frangoulidis, D. (2003): Laboratory-based diagnosis of brucellosis—a review of the literature. Part I: techniques for direct detection and identification of Brucella spp. *Clin. Lab.* 49, 487–505.
4. Ducrottoy M, Bertu WJ, Matope G, Cadmus S, Conde-Álvarez R, Gusi AM, Welburn S, Ocholi R, Blasco JM, Moriyón I (2017): Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Tropica* 165:179–193.
5. Garofolo G, Di Giannatale E, De Massis F, Zilli K, Ancora M, Cammà C, et al (2013): Investigating genetic diversity of Brucella abortus and Brucella melitensis in Italy with MLVA-16. *Infect Genet Evol.*,19:59–70.
6. Janowicz, A.; Massis, F. de; Ancora, M.; Cammà, C.; Patavino, C.; Battisti, A.; Prior, K.; Harmsen, D.; Scholz, H.; Zilli, K.; et al. Core Genome Multilocus Sequence Typing and Single Nucleotide Polymorphism Analysis in the Epidemiology of Brucella melitensis Infections. *J. Clin. Microbiol.* 2018, 56, doi:10.1128/JCM.00517-18.
7. Khan, A.U.; Melzer, F.; Sayour, A.E.; Shell, W.S.; Linde, J.; Abdel-Gilil, M.; El-Soally, S.A.G.E.; Elschner, M.C.; Sayour, H.E.M.; Ramadan, E.S.; et al. Whole-Genome Sequencing for Tracing the Genetic Diversity of Brucella abortus and Brucella melitensis Isolated from Livestock in Egypt. *Pathogens* **2021**, 10, 759, doi:10.3390/pathogens10060759.
8. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F, et al. (2006): Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*,6:9.
9. Menshawy, A.M.S.; Perez-Sancho, M.; Garcia-Seco, T.; Hosein, H.I.; García, N.; Martínez, I.; Sayour, A.E.; Goyache, J.; Azzam, R.A.A.; Dominguez, L.; et al. Assessment of genetic diversity of zoonotic Brucella spp. recovered from livestock in Egypt using multiple locus VNTR analysis. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014, 353876, doi:10.1155/2014/353876.
10. Wareth, G.; El-Diasty, M.; Melzer, F.; Schmoock, G.; Moustafa, S.A.; El-Beskawy, M.; Khater, D.F.; Hamdy, M.E.R.; Zaki, H.M.; Ferreira, A.C.; et al. MLVA-16 Genotyping of Brucella abortus and Brucella melitensis Isolates from Different Animal Species in Egypt: Geographical Relatedness and the Mediterranean Lineage. *Pathogens* **2020**, 9, doi:10.3390/pathogens9060498.
11. Whatmore, A.M. (2009): Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1168–1184.
12. Whatmore, A.M., Murphy, T.J., Shankster, S., Young, E., Cutler, S., Macmillan, A.P. (2005): Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type Brucella isolates of medical and veterinary interest. *J. Clin. Microbiol.* 43, 761–769.

1.3. Erläutern Sie die verwendeten Methoden.

Mit Ausnahme von definierten Referenzstämmen stammen alle verwendeten Proben aus Feldisolaten, welche einem Ausbruchsgeschehen bei Tieren (Rind, Schaf, Ziege, Kamel, Hund) und Menschen zugeordnet werden konnten. Die Proben wurden aus den Laboratorien des AHRI bzw. der Benha-Universität, zur Verfügung gestellt. Für die DNA-Präparation standen Reinkulturen aus eigener Isolierung bzw. abgetötetes Kulturmaterial zur Verfügung. Die Gesamtgenomsequenzierung wurde an die Firma Eurofins vergeben. Für die Analyse der Rohdaten wurde die Linux-basierte bioinformatische Pipeline WGSBAC (v.2.1.) des IBIZ Jena verwendet. Die

Speziesbestimmung erfolgte mittels Bruce-ladder PCR in silico mit Hilfe von Geneious v.11.1.5 oder nach Fragmentanalyse in der Kapillarelektrophorese. Für die Clusteranalyse und zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume wurde Bionumerics v.8.0 verwendet. Die MLVA mit 16 Markern erfolgte mittels MISTReSS in silico oder als Fragmentanalyse in der Kapillarelektrophorese. Phylogeografische Karten wurden mittels QGIS v3.12.2 erstellt.

2. Ergebnisse und Verwertbarkeit des Vorhabens

2.1. Bitte stellen Sie ausführlich die wichtigsten Ergebnisse des Projekts dar.

Für die Analyse der Verbreitung und Diversität von Ausbruchsstämmen von *Brucella* spp. konnten 47 Proben von *B. abortus* aus 11 Gouvernements und 137 Proben von *B. melitensis* aus 17 Gouvernements Ägyptens aus den Jahren 2001-2020 herangezogen werden.

Die Genotypisierung, basierend auf Unterschieden in cgSNPs oder der Fragmentlänge von VNTR-Markern, ermöglichte eine genaue Differenzierung auf Isolatebene. Für die Zuordnung von Genotypen zu Ausbruchsstämmen und damit deren Differenzierung wurden die epidemiologischen Metadaten, Zeitpunkt und Ort sowie Tierart der Isolierung, verwendet.

Die bisherige, mehrfach publizierte Annahme, dass Isolate mit unterschiedlichen MLVA-Strings, also unterschiedliche MLVA-Genotypen, auch unterschiedliche Ausbruchsstämme repräsentieren bzw. vice versa gleiche MLVA-Genotypen identische Ausbruchsstämme wurde in diesem Projekt widerlegt. Die im Vergleich fehleranfällige MLVA kann und sollte zuverlässig durch eine cgSNP-Analyse ersetzt werden.

Die Analysen ergaben ein völlig neues Bild der Diversität und Verteilung von *Brucella abortus* und *Brucella melitensis* in Ägypten. Danach gibt es eher alte Ausbruchsstämme, deren Ursprung wahrscheinlich in älteren Tierimporten aus dem europäischen Ausland (z. B. Italien und Großbritannien) liegt und, daneben, jüngere und sehr diverse Ausbruchsstämme, für die man einzelne jüngere Tierimporte verantwortlich machen könnte.

Im Einzelnen konnten Ausbruchsstämme mit einer zum Teil weiten Verbreitung über bis zu 5 Gouvernements nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine Verschleppung der Erreger mit Lebdntiertransporten oder über kontaminierte tierische Lebensmittel, vor allem Milchprodukte.

Diese Zuordnungen sind von größter Relevanz für eine zielgerichtete Analyse der epidemiologischen Situation des Vorkommens und der Verbreitungswege und -ursachen der Brucellose in Ägypten. Mit der hier etablierten Methodik hätten human- und veterinärmedizinische Einrichtungen ein Werkzeug in der Hand für die Etablierung von zielgerichteten Bekämpfungsmaßnahmen. Dieser Ansatz ist auf jegliche andere Region mit epidemischem Vorkommen von Brucellose übertragbar.

Ein wichtiger Meilenstein des Projekts war die Etablierung einer am Referenzlabor Brucellose, IBIZ FLI Jena, entwickelten bioinformatischen Pipeline auf dem „BinAC“-Server in Tübingen und der Einrichtung entsprechender externer Zugänge für die Bearbeiter in Hohenheim und am IBIZ. Damit sind die Grundlagen für die Auswertung von bakteriellen Gesamtgenomsequenzen, nicht nur für *Brucella* spp., an der Universität Hohenheim geschaffen worden.

Als ein zusätzlicher Arbeitspunkt zu den ursprünglich geplanten Methoden zur Genotypisierung wurde die canSNP-Analyse für *Brucella melitensis* nach Jeffrey Foster (Foster et al. 2018) in Hohenheim etabliert. Diese Methode ermöglicht die phylogeografische Einordnung von Isolaten

von *B. melitensis* und damit die Etablierung eines hierarchischen Typisierungsschemas für neue Feldisolate von *Brucella* spp.

Im Rahmen des Workshops zur Eröffnung des Projekts an der Faculty of Veterinary Medicine University of Nairobi, in Kenia, vom 21.-29. März 2019 erhielten wissenschaftliche und technische Mitarbeiter der Fakultät Veterinärmedizin der Universität Nairobi ein viertägiges Training in Probenauswahl, Probennahme und Impfung von Nutztieren sowie der Labordiagnostik für Brucellose.

An weiteren 4 Tagen wurden die theoretischen Grundlagen zur Bakteriologie, Diagnostik, Epidemiologie und Immunologie der Brucellose an Teilnehmer aus der Universität, Veterinäre und Mediziner vermittelt. Die ursprünglich eingeladenen Teilnehmer aus verschiedenen Ministerien sowie der Zoonosis disease Unit Kenia nahmen nicht teil. Alle Vorträge und Vorführungen wurden durch die Partner aus Spanien, Universität Navarra und CITA und die Univ. Hohenheim organisiert.

Der analog zum Event in Kenia geplante Workshop in Uganda konnte aufgrund fehlender Finanzmittel nicht stattfinden. Erst am 29. Juni 2020 fand eine Online-Veranstaltung zum Projektbeginn statt, mit Vorstellung des Projekts für lokale Teilnehmer der Universität Kampala. Eine weitere Online-Veranstaltung mit Vorträgen zu Grundlagen der Impfstrategien gegen Brucellose wurde durch die Partner in Uganda und Spanien für den 1. Feb. 2022 organisiert. Teilnehmer dieser Veranstaltung waren Studenten der Veterinärfakultät der Makerere Universität.

Kernaussagen und Policy advice:

Bereits in einer sehr frühen Phase des Projekts MUSBCEA hatte Dr. Beyer in einer E-Mail vom 20. Februar 2019 an die BLE darauf hingewiesen, dass es, während die Arbeiten beim deutschen Partner gemäß dem Arbeitsplan im August 2018 mit der Beschäftigung einer Doktorandin begonnen hatten, zu gravierenden finanziellen Problemen bei allen anderen Projektpartnern gekommen war, mit vorhersehbaren negativen Folgen für das gesamte Vorhaben.

Im Midterm report des PL des Projekts, Prof. Joseph Erume, Makerere University, Uganda stand zu lesen:

“The project is facing a number of challenges.

- Key among which is the lack of disbursement of funds by the Uganda government. This is causing a lot of frustration in the consortium and research uptake. The whole planned activities of the project are basically on hold and we are wondering as to what can be done to accomplish work as planned.
- More than half the project’s life time has been lost without proper activities due to Ugandan funding situation.
- The students from Uganda and Germany already enrolled since September 2018 but up to now have not commenced their studies.
- Lack of funding from Uganda, made the European partners to support Ugandan students to attend the launch and training in Kenya in March 2019. This caused a strain in the finances of these partners since this was not planned for.
- The Consortium members in Europe are finding it very cumbersome and difficult to provide mandatory project progress reports with no activities going on.
- The project Coordinator is finding it difficult to coordinate the project activities without resources.

- The money released in Kenya is less than expected and this is constraining accomplishment of the project activities
- The procurement procedures in Kenya are too tedious and long and this is causing unnecessary delays in execution of project activities.
- In Kenya there is slow progress towards isolation of Brucella from the collected samples since up to now approval for use of KEMRI lab has not been granted."

Diese im Report angesprochenen Probleme verstärkten sich zunehmend im Verlauf des Projekts. Dazu kamen weitere strukturelle und mit der Corona-Pandemie verbundene Probleme, z. B. „Lock downs“ sowie aus- und inländischen Reisebeschränkungen, welche bis zur Beendigung des deutschen Projektteils im Dezember 2021 fortbestanden.

Im Folgenden werden einige der Probleme und ihre Auswirkung auf die Kooperationen mit den afrikanischen Partnern angesprochen.

Kooperation mit Makerere University, Uganda

Nach Mitteilung des Projektleiters, Prof. Joseph Erume, wurde dem Projekt in Uganda Mitte der Jahre 2020 und 2021 eine Teilfinanzierung für jeweils 3 Monate ausgezahlt. Davon behielten sowohl MOSTI als auch die Makerere University in Kampala ein Overhead von jeweils 15 % der Fördersumme ein. Mit dieser völlig unzureichenden Unterfinanzierung konnten die geplanten Aktivitäten vor Ort nicht durchgeführt werden, weder die notwendige Feldforschung, noch entsprechende Laborarbeiten, noch die geplanten Workshops. Daher wurden durch den deutschen Partner Mittel aus dem eigenen Budget bereit gestellt, z. B. für Reisekosten der Wissenschaftler aus Uganda zum Eröffnungsmeeting in Kenia sowie dort für den Transport aller Teilnehmer zu Workshops bei Farmen, für die Finanzierung des Ethik-Votums für Uganda und für eine entsprechende Bestellung und Lieferung von Verbrauchsmitteln an das Labor in Kampala, in 2020. Bestellungen aus Eigenmitteln der Universität wurden als nicht zielführend erklärt, da mit erheblichen regulatorischen Komplikationen an der Universität Kampala verbunden und daher zu zeitaufwändig. Trotz mehrfacher Zusage einer ortsansässigen Firma in Kampala wurde die Auslieferung der Bestellung über die Universität Hohenheim nur unzureichend ausgeführt, sodass bis zum Ende des Projekts die Arbeitsfähigkeit des Labors an der Makerere Universität nicht ausreichend hergestellt werden konnte.

Aufgrund zusätzlicher Probleme mit Covid-19, Uganda war Hochrisikogebiet und befand sich noch von Mai-August 2021 im Lock down, sowie der Heuschreckenplage 2019/2020 konnten vor Ort keine Probennahmen nach Erhalt der ersten Finanzierungsrunde geplant werden. Diese Schwierigkeiten verhinderten auch den ursprünglich geplanten 6-monatigen Forschungsaufenthalt der deutschen Doktorandin in Uganda. Erst in der 2. Hälfte 2021 konnten erste Laborarbeiten in Uganda stattfinden und bis zum September 2021 wurden im Labor in Kampala insgesamt 15 Brucella-Stämme aus Proben isoliert, deren Versendung zur Genotypisierung aber bis zum Projektende im Dezember 2021 nicht mehr erfolgreich organisiert werden konnte.

Kooperation mit University of Nairobi, Faculty of Veterinary Medicine, Kenia

Wie bereits im Zwischenbericht an die BLE vom 24.04.2020 erläutert, wurden dem kenianischen Partner in 2019 lediglich 7.500 Euro statt der geplanten 40.000 Euro für drei Forschungsjahre ausbezahlt. Im Jahre 2020 erfolgte keine weitere Finanzierung der Kooperationspartner an der Universität Nairobi, Kenia. Die Summe war in keiner Weise ausreichend für die ursprünglich geplanten Aktivitäten zur Probensammlung und Bearbeitung durch Personal der Universität.

Darüber hinaus verfügt die Universität in Nairobi über kein eigenes Sicherheitsstufe 3 bzw. Stufe 2plus - Labor, in dem die *Brucella* Isolate kultiviert werden könnten. Dies wäre aber eine *Conditio sine qua non* für alle weiteren Analysen beim deutschen Partner gewesen und auch dementsprechend im Original des Projektantrags ausgewiesen. Das Manko war dem MUSBCEA-Konsortium nicht bekannt und wurde erstmalig während des Projektmeetings im April 2019 an der Universität Nairobi angesprochen. Überlegungen zur kurzfristigen Etablierung eines entsprechenden Labors in einer Partnerfakultät der Universität führten zu keinem Ergebnis. Die einzig mögliche Alternative eines zugelassenen S3 Labors befand sich am Kenyan Medical Research Institute (KEMRI) in Nairobi. Trotz intensiver Kontakte von Dr. Beyer mit dem Vertreter des KEMRI gelang es nicht, vom japanischen Betreiber des Labors eine Zugangsberechtigung bzw. ein Arbeitszeitfenster für das Projekt MUSBCEA zu erhalten. Über entsprechende Aktivitäten des Partners an der Universität Nairobi ist nichts bekannt. In Verbindung mit den auch für Kenia geltenden Covid-19 Beschränkungen führten die genannten Schwierigkeiten in Summe dazu, dass der ursprünglich für 6 Monate geplante Forschungsaufenthalt der Doktorandin aus Deutschland nicht stattfinden konnte. Über die Isolierung von *Brucella* aus gesammelten Feldproben gibt es keinerlei Informationen vom kenianischen Projektpartner. Die entsprechenden Mittel im Budget wurden schwerpunktmäßig auf die aufgestockte Anzahl der Gesamtgenomsequenzierungen umgebucht bzw. am Jahresende 2020 an die BLE zurückgezahlt.

Kooperation mit AHRI, Ägypten und FLI Jena

Hintergrund der Assoziierung eines weiteren Partners aus Ägypten in das MUSBCEA-Projekt war die im Laufe der Beratungen mit den Partnern aus Spanien, Uganda und Kenia, während des Workshops in Nairobi im März 2019, entstandene Idee einer Erweiterung der ursprünglichen Zielstellungen des Projekts. Dabei sollten die gesammelten epidemiologischen und phylogenetischen Daten genutzt werden, um langfristig eine zeitlich und geografisch mit phylogenetischen Markern verknüpfte Karte der Ausbreitung der Brucellose entlang historischer Handelswege sowohl zwischen den Ländern südlich und nördlich der Sahara als auch in Nordafrika zu erarbeiten. Derartige, auf Gesamtgenom-Analysen und entsprechenden epidemiologischen Metadaten beruhende phylogeografische Analysen sind z. B. aus der Anthrax-Forschung wohl bekannt und publiziert. Die skizzierte Zielstellung ist als ein längerfristiges Projekt zu sehen, wofür mit dem aktuellen Projekt die Grundlage im Sinne der Zusammenarbeit kompetenter Partner und die Zusammenführung bereits vorhandener und neuer Datenbank-Sätze geschaffen werden sollte. Die Erweiterung der Partnerschaft um den ägyptischen Partner wurde durch die zuvor bestehende langjährige Kooperationen zwischen dem Fachgebiet für Infektions- und Umwelthygiene bei Nutztieren (ehemals Institut für Umwelt- und Tierhygiene) der Universität Hohenheim und dem FLI Jena und aktuell dem dortigen deutschen und OIE-Referenzlabor für Brucellose möglich. Ein erstes Kennenlernen der Partner aus Ägypten fand während eines internationalen Treffens in Palermo, Juni 2019, anlässlich der Abschlussveranstaltung zum Projekt „Brucellosis in the mediterranean countries“ statt. Unserem Projekt und den darin beschäftigten Wissenschaftlern wurde die Möglichkeit eröffnet, an allen bestehenden Kooperationen zu partizipieren. Dies betraf insbesondere die Aus- und Weiterbildung sowie experimentelle Arbeiten vor Ort für die Doktorandin, Frau Katharina Holzer, sowie die gemeinsame Bearbeitung von Probenmaterial des Referenzlabors in Jena.

Während eines Forschungsaufenthalts von PD Dr. Beyer und Frau K. Holzer in Kairo und Mansoura, im November 2019, wurden die folgenden Forschungseinrichtungen besucht und Gespräche zum Ausbau der Kooperationsbeziehungen geführt:

- Animal Health Research Institute, Kairo,
- Benha University, Benha,
- Animal Health Reserach Institute, Provincial Lab, Mansoura.

Frau Holzer und Dr. Beyer hielten eingeladene Vorträge auf der durch AHRI in Mansoura organisierten Konferenz „Brucellosis and abortion in sheep“ zur Vorstellung des MUSBCEA Projekts sowie Fachvorträge zum Thema Brucellose (Spezies, Infektion bei Tier und Mensch, Übertragung, Virulenz, Sicherheit) und die Genotypisierung von Brucellen. Die Projekterweiterung beinhaltete neben dem Forschungsaufenthalt der Doktorandin in Ägypten insbesondere die Sammlung und Bearbeitung von Probenmaterial aus den Instituten in Kairo und Mansoura. Entsprechende Budgetänderungen wurden durch die BLE genehmigt. Ein weiterer Workshop bzw. bereits geplante Tätigkeiten im Feld durch die UHO in Ägypten konnten aufgrund der Pandemie und der damit verbundenen strikten Reiseverbote nicht mehr erfolgen. Von den 313 aus Ägypten stammenden Proben konnten 191 publizierbare Gesamtgenomsequenzen erstellt werden.

- 2.2. Benennen Sie den voraussichtlichen Nutzen und die Verwertbarkeit der Ergebnisse. Welche praxisrelevanten Ergebnisse wurden im Projekt erzielt? Bitte erläutern Sie, inwiefern diese Ergebnisse direkt praktisch anwendbar sind und welche Möglichkeiten Sie für einen Transfer dieser Ergebnisse in die Praxis sehen.

Die im deutschen Anteil des Projekts erzielten Ergebnisse dokumentieren beispielhaft die Verbreitung und mögliche Verbreitungswege der Brucellose in Ägypten über einen Zeitraum von etwa 10 Jahren.

Die dabei etablierten Methoden können als Blaupause für die Entwicklung von staatlichen Bekämpfungsprogrammen der verantwortlichen Behörden im Landwirtschafts-, Human- und Veterinärsektor verwendet werden. Den Behörden wird damit die Möglichkeit gegeben, gezielt auf die Einfuhr und Verbreitung der Erreger der Brucellose Einfluss zu nehmen, die Quellen und die Verbreitung von Ausbrüchen nachzuverfolgen und ggf. zu unterbinden.

Für die Umsetzung derartiger Programme ist die Etablierung der Methoden in landeseigenen führenden Laboratorien notwendig, verbunden mit dem Wissenstransfer zu den naturwissenschaftlich-medizinischen Grundlagen sowie den technischen Voraussetzungen. Dieser Transfer war im ursprünglichen Ansatz des Projekts MUSBCEA enthalten, z. B. durch Schulungen von Mitarbeitern in Uganda und Kenia vor Ort bzw. durch Trainingsaufenthalte von Mitarbeitern aus Uganda, Kenia und Ägypten im deutschen Labor der Universität Hohenheim. Diese Vorhaben konnten aufgrund der benannten Probleme, die katastrophale finanzielle Unterversorgung der Partner in Uganda und Kenia, mangelnde strukturelle Voraussetzungen in Kenia und die mit Corona verbundenen Reisebeschränkungen in und zwischen allen Ländern in 2020 und 2021 nicht umgesetzt werden.

- 2.3. Welche Empfehlungen können Sie aus den erzielten Ergebnissen ableiten?

Mit der Etablierung der Differenzierung von Brucella-Genotypen mittels cgSNP-Analyse in Verbindung mit der Zuordnung der Genotypen zu durch epidemiologische Metadaten definierten Ausbruchsstämmen konnten die Diversität und Verbreitung der Brucellose in Ägypten beispielhaft

analysiert werden. Diese Methodik sollte in allen künftigen Bekämpfungsprogrammen zur Brucellose Verwendung finden.

2.4. Welche möglichen weiterführenden Fragestellungen bzw. Anknüpfungspunkte sehen Sie?

Die genotypische Analyse von Ausbruchstämmen der Brucellose könnte nach Etablierung in entsprechenden Laboratorien einen wesentlichen Beitrag zur Brucellosbekämpfung in allen Ländern leisten, in denen die Brucellose endemisch ist. Entsprechende Projekte sollten daher in weiteren Ländern gestartet werden. Grundsätzlich bleibt die Verbreitung der Brucellose auf dem afrikanischen Kontinent, nördlich der Sahara, eine wichtige offene Frage. Während bisherige Programme im Wesentlichen den Eintrag und die Verbreitung der Brucellose im mediterranen Raum betrachtet haben, sollten künftige Projekte nach dem Süden ausgedehnt werden. Dabei sollte der Fokus auf den historisch traditionellen Handelsrouten liegen, also z. B. entlang des Nils.

2.5. Führen Sie bisherige sowie geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse auf.

Gesamtgenomsequenzen werden in die internationale Datenbank am National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der BioProject number PRJNA742519 und folgende eingestellt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/742519>, accessed on 9 September 2021) eingestellt, sofern sie Bestandteil einer Publikation sind. Die MLVA-Daten werden vollständig der frei zugänglichen MLVA Datenbank (<https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/54>) zur Verfügung gestellt.

Diese und alle weitere Daten werden zusammen mit den jeweiligen Projektpartnern in wissenschaftlichen Zeitschriften sowie auf entsprechenden Tagungen publiziert.

2.6. Bitte geben Sie eine Übersicht über alle im Berichtszeitraum realisierten Veröffentlichungen (Publikationen, Printmedien, Newsletter, etc.). Bitte als gesonderte Anlage beifügen.

J. Erume, W. Beyer, I. Moriyon, I. Marco, J.M. Blasco, L.C. Beborra, J.M. Figueres and P.R. Blanco:
“Multi-sectorial strategy for brucellosis control in Eastern Africa”
LEAP-Agri Project’s Kick-Off Meeting of ERA-Net LEAP-Agri Funded Projects
8 – 10 October 2018 | Bari, Italy

Wolfgang Beyer: “Molecular Genotyping of Isolates”; “University of Hohenheim and contribution to MUSBCEA”

Katharina Holzer: “Methods for genotyping of different *Brucella* species”
Vorträge anlässlich des Kick-off meeting, University of Nairobi, Department of Clinical Studies
College of Agriculture and Veterinary Medicine, Upper Kabete, Nairobi Kenya, 21.-29.3.2019

Wolfgang Beyer: “Molecular Genotyping of Isolates”

Katharina Holzer: „ The terroristic microorganism—molecular biology of *Brucella*”
Vorträge anlässlich der AHRI-Tagung: „Brucellosis and Abortion in sheep“, Mansoura, Ägypten,
04.11.2019

Holzer, K.; El-Diasty, M.; Wareth, G.; Abdel-Hamid, N.H.; Hamdy, M.E.R.; Moustafa, S.A.; Linde, J.; Bartusch, F.; Sayour, A.E.; Elbauomy, E.M.; Elhadidy, M., Melzer F.; Beyer W.: Tracking the Distribution of *Brucella abortus* in Egypt Based on Core Genome SNP Analysis and In Silico MLVA-16. *Microorganisms* **2021**, 9, 1942. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091942>.

In Vorbereitung:

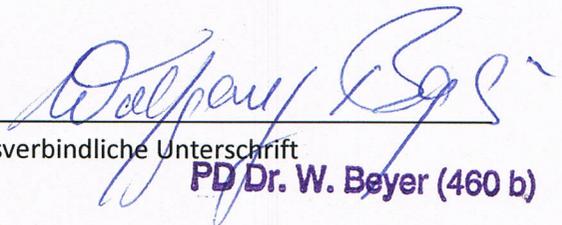
Holzer, K., El-Diasty, M., Wareth G., Abdel-Hamid, N.H., Hamdy, M.E.R., Moustafa, S.A., Linde, J., Bartusch, F., Sayour A., Elhadidy, M., Melzer, F., Beyer, W.: Tracking the distribution of *Brucella melitensis* in Egypt based on core genome SNP analysis and MLVA-16. (Manuskript in Vorbereitung).

Katharina Holzer: „Untersuchung der spatio-temporalen Verbreitung von Brucellose-Ausbruchsstämmen in Ägypten mittels cgSNP-Analyse und Multi-Locus VNTR-Analyse“, 2022. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.). Fakultät Naturwissenschaften, Universität Hohenheim.

Hohenheim, 22.03.22

Ort, den

rechtsverbindliche Unterschrift



PD Dr. W. Beyer (460 b)