

Virusnachweis

Molekulare Identifikation von Hantaviren in neuen Wirten

PETER T. WITKOWSKI, PATRICK HEINEMANN, BORIS KLEMPA, DETLEV H. KRÜGER
INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE VIROLOGIE, HELMUT-RUSKA-HAUS,
CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

In addition to classical virus isolation in cell culture, the molecular detection of new virus variants by PCR techniques allows broader epidemiological insights into the world of viral pathogens. For the detection of hantaviruses – zoonotic viruses leading to fever and organ failure in humans – we developed a genus-wide nested RT-PCR format, which enables the discovery of new members within this virus genus. The methodological approach allowed the demonstration of first hantaviruses from Africa and revealed new hantavirus reservoir hosts, as shrews, moles, and bats.

DOI: 10.1007/s12268-015-0609-4
© Springer-Verlag 2015

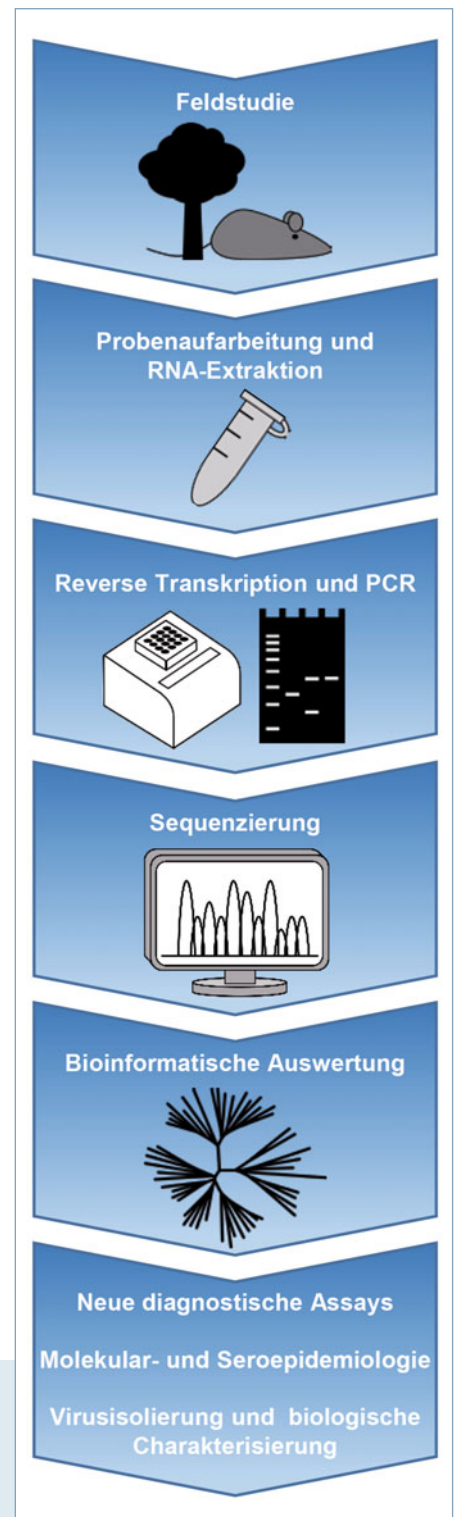
PCR als Tool der aufsuchenden Virusdiagnostik

Das Auffinden neuer Viren als Krankheitserreger geschieht klassischerweise über die Virusisolierung in der Zellkultur. In der aufsuchenden Virusdiagnostik nutzt man dazu eine Reihe von Zelllinien in der Hoffnung, dass sich wenigstens eine davon für die Vermehrung des noch unbekanntes Virus als geeignet erweist. Im Zellrasen lässt sich der zytopathische Effekt nachweisen, eine Auflösung der lichtmikroskopisch sichtbaren Struktur des Zellverbandes. Nicht alle Viren sind jedoch in der Lage, sich in den angebotenen Zellkulturen zu vermehren. Selbst wenn die Virusanzucht gelingt, ist die Prozedur langwierig und zunächst unspezifisch, zudem erfordert der Test frisches Probenmaterial, da intakte Viruspartikel zur Vermehrung benötigt werden.

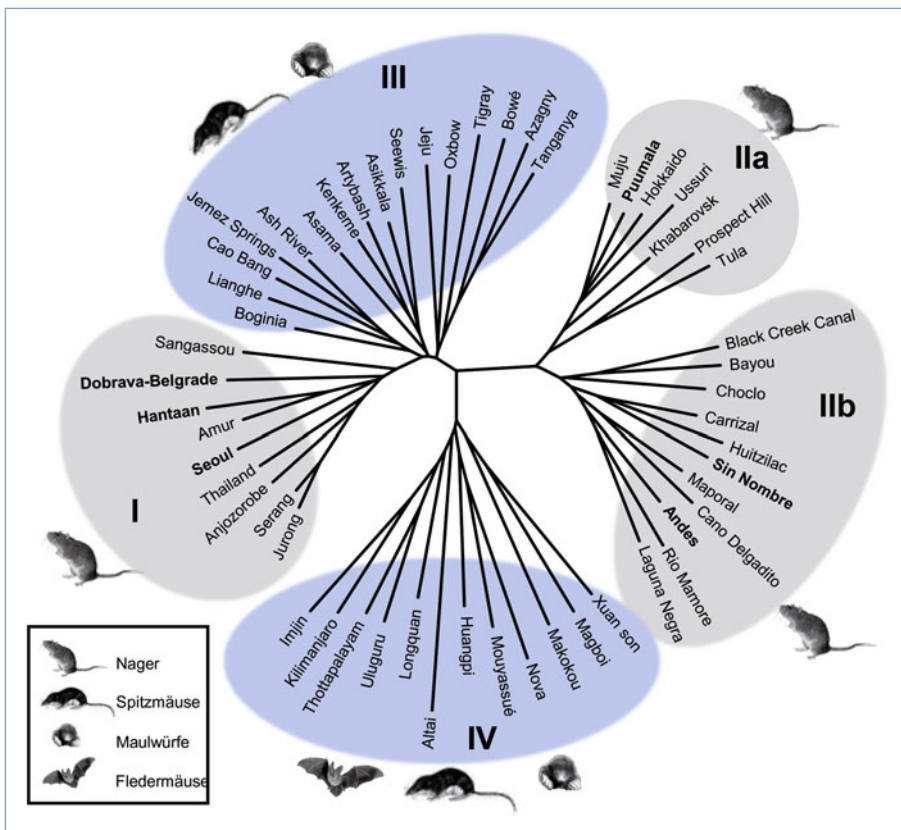
Die molekulare Detektion neuer Viren mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) bietet demgegenüber

etliche Vorteile. Die PCR wurde zum ersten Mal in den 1970er-Jahren erwähnt [1] und später von M. Smith und K. B. Mullis optimiert, wofür ihnen 1993 der Nobelpreis verliehen wurde. Die ursprüngliche Methode basiert auf der Bindung spezifischer, kurzer Oligonukleotide an eine Zielsequenz, die für die DNA-Polymerase als Primer dienen. Die von den Primern flankierte Sequenz wird von der Polymerase in aufeinanderfolgenden zyklischen Arbeitsschritten des Anlagerns der Primer, der Elongation und der Denaturierung der entstandenen Doppelhelix kopiert und idealerweise in jedem Zyklus verdoppelt. Die einzelnen Schritte sind temperaturabhängig.

Mit der PCR wurde es möglich, den Nachweis von viralen Genomen aus dem genetischen Material (DNA bzw. RNA) einer Blut- oder Gewebeprobe direkt durchzuführen. Bei bekannten Viren (die die Verwendung optimierter Primersequenzen ermöglichen) kann dieser Nachweis heute sehr spezifisch und



► **Abb. 1:** Arbeitsablauf bei der Suche nach neuen Hantaviren. Im Rahmen von Feldstudien werden kleine Säugetiere gefangen und Organproben gesammelt. Virale RNA wird aus den Proben aufgereinigt. Mittels reverser Transkription wird die Virus-RNA in cDNA umgeschrieben und anhand der PCR amplifiziert. Die neu gewonnenen Sequenzinformationen dienen dann als Basis für weitere funktionelle Studien.



▲ **Abb. 2:** Stammbaum der Hantaviren. Die bekannten Hantaviren können in fünf unterschiedliche phylogenetische Gruppen gegliedert werden. Die Viren der Gruppen III und IV, die ausschließlich von Spitzmäusen, Maulwürfen und Fledermäusen beherbergt werden, wurden mithilfe der neu entwickelten Pan-Hanta-PCR entdeckt. Die wichtigsten humanpathogenen Vertreter sind fett markiert. Das erste in Afrika molekular nachgewiesene Hantavirus, Sangassou-Virus, gehört zur Phylogruppe I und wurde inzwischen auch in der Zellkultur isoliert und funktionell charakterisiert.

sensitiv erfolgen – hierbei können zehn und weniger Kopien des viralen Genoms in einer Probe detektiert werden.

Während der Untersuchung von Krankheitsausbrüchen mit unbekannter Ursache oder in der Feldforschung zur Charakterisierung neuartiger Viren ist es von besonders hoher Bedeutung, ein *open view*-Format zu verwenden, das möglichst auch neue Viren sowie noch unbekannte Varianten eines Virus detektieren kann. Im Falle von RNA-Viren (wie den Hantaviren) besteht durch die grundsätzlich hohe Diversität ihres Genoms aufgrund fehlender Korrekturlesemechanismen während der Replikation eine zusätzliche Herausforderung in der Entwicklung von PCR-Assays. Die PCR eröffnet also neue Möglichkeiten in der aufsuchenden Virologie. Selbstverständlich werden dann aber bei erfolgreichem molekularem Nachweis neuer Viren die Bemühungen nachgeschaltet, das Virus zu isolieren, um seine funktionellen Eigenschaften zu klären (**Abb. 1**).

Hantaviren als *emerging viruses*

Hantaviren bilden ein Genus innerhalb der Familie der Bunyaviren. Sie sind umhüllte Viren mit einem segmentierten RNA-Genom negativer Polarität. Man bezeichnet sie als *emerging viruses*, weil unsere Kenntnisse zu ihrer Bedeutung als Krankheitserreger beim Menschen sowie zu ihrer geografischen Ausbreitung schnell zunehmen. Sie werden von kleinen Säugetieren (die Virusreservoir sind) auf den Menschen übertragen und verursachen hämorrhagische Fieber mit renaler und kardiopulmonaler Manifestation. Bei Infektion mit bestimmten Hantaviren kann die Sterblichkeit bis zu 50 Prozent betragen [2]. In Deutschland treten das Puumala-Virus und das Dobrava-Belgrad-Virus als Krankheitserreger auf [3, 4].

Bisher waren allein Nagetiere (Ratten, Mäuse, Wühlmäuse) als natürliche Reservoir für die einzelnen Hantavirus-Spezies angesehen worden. Bis 2007 war lediglich ein Hantavirus bekannt, welches nicht mit einem Nagetier-

wirt assoziiert war (Thottapalayam-Virus) und das über lange Zeit nicht als Hantavirus klassifiziert wurde [5].

Nach ihrer ersten Beschreibung in den 1970er-Jahren sind Mitglieder des Genus Hantavirus zunächst in Asien und Europa als Erreger zoonotischer Erkrankungen identifiziert worden. Erst im Jahr 1993 wurden zum ersten Mal „Neuwelt-Hantaviren“ in den USA und später auch in Südamerika als Pathogene gefunden [6]. Australien und Afrika verblieben seitdem als *Terra incognita* in Bezug auf das Vorkommen von Hantaviren.

Pan-Hanta-PCR

In Afrika als wichtigem *hot spot* der Biodiversität von Viren wurden von uns im Jahr 2005 erste Felduntersuchungen zum Vorkommen und zur klinischen Bedeutung von (neuen) Hantaviren durchgeführt. Da keine einheimischen Hantaviren bekannt waren, musste eine neue PCR-Diagnostik etabliert werden. Hierbei kamen degenerierte Primer zum Einsatz. Diese bestehen aus einer Mischung von Primern, die an wenig konservierten Stellen des Genoms unterschiedliche Nukleotide enthalten und so die Bindung an verschiedene Nukleotidbasen auf dem komplementären Strang der Nukleinsäure ermöglichen. Andererseits ist auch der Einsatz von Inosin möglich – es handelt sich dabei um ein Nukleosid, das Basenpaarungen mit allen vier vorkommenden Basen der Nukleinsäure eingeht. Ein Nachteil des Inosins ist, dass die von ihm vollzogenen Basenpaarungen energetisch ungünstiger sind als eine natürliche Watson-Crick-Basenpaarung.

Der Vergleich von genomischen Sequenzen der zu dieser Zeit bekannten Hantaviren hat gezeigt, dass Teile des viralen Polymerasegens über Positionen mit sehr hoher Sequenzkonservierung verfügen. Sind solche Bereiche 20 bis 30 Nukleotide lang und enthalten einen ausgeglichenen Gehalt an Guanin-Cytosin-Paarungen, so können zumeist leicht degenerierte Primer eingesetzt werden. Die Variabilität der Sequenz zwischen den Primer-Bindungsstellen kann höher sein, da es hier nicht auf eine spezifische Bindung ankommt. Ein großer Nachteil dieser Methode ist die erhöhte Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Bindung der Primer an Nukleotide, die nicht zum viralen Genom gehören. Die darauffolgende Auswertung anhand der Gelelektrophorese ergibt häufig viele unspezifische Banden, die zur Bestätigung der Ergebnisse mittels Sanger-Sequenzierung

überprüft werden müssten. Um diesen Nachteil auszugleichen und gleichzeitig einen möglichst universellen PCR-Assay zu erhalten, wurde von uns ein weiteres degeneriertes Primerpaar verwendet, welches innerhalb des Abschnitts lag, der durch die erste PCR amplifiziert wurde. Es entstand eine *nested PCR* (nPCR) mit zwei zeitlich hintereinander geschachtelten Kettenreaktionen, von denen nur die zweite elektrophoretisch ausgewertet wird. Das Produkt der ersten Reaktion dient in kleiner Menge als Edukt für die zweite und unterdrückt auf diese Weise die Entstehung unspezifischer Produkte. Mit der so entstandenen „Pan-Hanta-PCR“ wurden 2006 die ersten afrikanischen Proben getestet und zwei neuartige, natürlich vorkommende Hantaviren im westafrikanischen Guinea gefunden [7, 8].

Trotz der genannten Vorteile ist der Einsatz der nPCR sehr aufwendig. So müssen für jede Probe zwei PCR-Reaktionen erfolgen. Die Verwendung degenerierter Primer führt auch zur niedrigeren Sensitivität der Methode. Der Einsatz von Probenpools, in denen Material

mehrerer Testtiere vereinigt ist, kann den arbeitszeitlichen Aufwand des Screenings reduzieren, jedoch wird die Sensitivität dadurch gesenkt.

Nach einem primären Screening mit positivem Befund kann die Sensitivität erhöht werden, indem die Genomsequenz des neuartigen Virus als Grundlage für das Design einer hochspezifischen quantitativen Real-Time-PCR (qPCR) dient. Die qPCR verwendet ein zusätzliches Oligonukleotid, das an ein Fluorochrommolekül gebunden ist, welches als Sonde dient. Das PCR-Produkt kann in Echtzeit durch die Messung emittierter Lichtsignale quantifiziert werden. Die erforderliche Spezifität solcher Sonden verhindert jedoch ihren Einsatz zur Detektion nicht charakterisierter Virusvarianten.

Probensammlungen, die nach einem primären Screening mittels nPCR einen positiven Nachweis liefern, können potenziell einen noch höheren Anteil positiver Befunde liefern, wenn sie anschließend mit der spezifischen qPCR erneut getestet werden. Spezifische Untersuchungen (z. B. einer neuen



▲ **Abb. 3:** Feldarbeit in Afrika zum Nachweis von Hantaviren in kleinen Säugetieren.

Reservoirspezies) dienen der Bestimmung des Aufkommens des Virus im natürlichen Wirt und ermöglichen erste Aussagen zur Virusökologie. Mittels phylogenetischer Analysen werden evolutionäre Zusammenhänge innerhalb der untersuchten Virusfamilien verdeutlicht. Die spezifische qPCR kann ebenfalls zur Bestimmung der Viruslast in Patienten verwendet werden, wenn der Erreger bekannt ist [9].

Hantaviren in neuen Reservoirwirten

Seit 2006 wurden mittels neuer Testmethoden viele neuartige Hantaviren identifiziert. Neben dem ersten afrikanischen Hantavirus aus einer Maus (Sangassou-Virus) wurde auch das erste Insektivoren-assoziierte Hantavirus (Tanganya-Virus) ebenfalls in Afrika gefunden [7, 8]. Durch die Nutzung des von Klempa und Kollegen [7] veröffentlichten Pan-Hanta-Assays war es auch anderen Forschern weltweit möglich, das Spektrum bekannter Hantaviren enorm zu erweitern [10]. Seit 2006 wurden mehr als 30 neue Hantaviren molekular nachgewiesen, viele davon in vorher unerwarteten Reservoirwirten, wie Spitzmäuse und Maulwürfe aus der Ordnung der Insektenfresser.

Einen weiteren Meilenstein in der Erforschung der molekularen Epidemiologie dieser Viren stellt der erste Fund von Fledermaus-assoziierten Hantaviren dar [11]. Fledermäuse und Flughunde werden als Träger vieler zoonotischer Viren, wie Ebolavirus oder SARS-Coronavirus, angesehen. Sie sind in der Lage, durch die Größe ihrer Populationen Pathogene effektiv zu erhalten und durch ihre Mobilität ebenso zu verbreiten. Es sind mittlerweile weitere Hantaviren aus Fledermäusen beschrieben, deren pathogenes Potenzial für den Menschen jedoch insgesamt noch unbekannt ist. Zurzeit wird darüber diskutiert, ob Hantaviren, die als nicht von Insekten übertragene Viren eine Ausnahme innerhalb der Familie der Bunyaviren bilden, im Laufe ihrer Evolution einen Wirtswechsel von Insekten in insektenfressende Fledermäuse vollzogen haben [12].

Abbildung 2 zeigt einen molekularphylogenetischen Stammbaum, der die Verwandtschaftsgrade der Hantaviren untereinander verdeutlicht und fünf Gruppen umfasst. Zu den klassischen Phylogruppen der Viren, die von echten Mäusen (Gruppe I), Wühlmäusen (Gruppe IIa) und Neuweltmäusen (Gruppe IIb) beherbergt werden, sind nun zwei neue Gruppen gekommen, die eine große Zahl neuer, bisher meist nur molekular nachgewiesener Viren umfassen, die von Spitzmäusen, Fledermäusen und Maulwürfen getragen werden.

Obwohl in den letzten Jahren die Entwicklung des *Next Generation Sequencing* schnell voranschreitet, haben unsere Erfahrungen gezeigt, dass die Anwendung dieser Technologie zur Detektion von RNA-Viren mit einem segmentierten Genom direkt aus biologischem Probenmaterial noch nicht zufriedenstellend etabliert ist. Solange die Optimierung

dieser Methodologie nicht ausreichend fortgeschritten ist, wird die PCR als klassische Methode für die aufsuchende Virusdiagnostik weiterhin ihren Bestand haben.

Afrika als Schmelztiegel neuer Viren

Afrika gilt als Schmelztiegel bei der Entstehung neuer Viren, auch der AIDS-Erreger vollzog hier den Wirtswechsel vom Tier zum Menschen. Während Malaria, AIDS und Tuberkulose die großen Herausforderungen bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten in Afrika darstellen, dürften Hantavirus-Erkrankungen zu den vernachlässigten Krankheiten (*neglected diseases*) gehören. Die Durchführung von Probensammlungen im Feld (**Abb. 3**), der ordnungsgemäße Transport unter strenger Einhaltung der Kühlkette sowie die korrekte Probenaufarbeitung sind Vorbedingungen für die Durchführung der PCR, die vor Ort oft nur mit großen Anstrengungen zu realisieren sind. Das PCR-gestützte Auffinden der verschiedenen Viren in den natürlichen Reservoiren ist wiederum die Voraussetzung dafür, ihre Rolle als mögliche Krankheitserreger des Menschen zu untersuchen.

Danksagung

Wir danken Frau Brita Auste für ihre exzellente technische Unterstützung der Arbeiten zur molekularen Epidemiologie von Hantaviren. Außerdem möchten wir die sehr gute Kooperation mit der Gruppe von Dr. Fabian Leendertz am Robert Koch-Institut und mit einer Vielzahl afrikanischer und deutscher Partner hervorheben, ohne die unser Projekt nicht möglich wäre. Wir bedanken uns bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung – insbesondere im Rahmen der „Deutsch-Afrikanischen Kooperation in der Infektiologie“.

Literatur

- [1] Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R et al. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56:341–361
- [2] Krüger DH, Figueiredo LT, Song JW et al. (2015) Hantaviruses – globally emerging pathogens. *J Clin Virol* 64:128–136
- [3] Ettlinger J, Hofmann J, Enders M et al. (2012) Multiple synchronous outbreaks of Puumala virus, Germany, 2010. *Emerg Infect Dis* 18:1461–1464
- [4] Hofmann J, Meier M, Enders M et al. (2014) Hantavirus disease in Germany due to infection with Dobrava-Belgrade virus genotype Kurkino. *Clin Microbiol Infect* 20:O648–655
- [5] Carey DE, Reuben R, Panicker KN et al. (1971) Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res* 59:1758–1760
- [6] Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S et al. (1993) Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262:914–917

- [7] Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E et al. (2006) Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis* 12:838–840
- [8] Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E et al. (2007) Novel hantavirus sequences in shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis* 13:520–522
- [9] Kramski M, Meisel H, Klempa B et al. (2007) Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing. *Clin Chem* 53:1899–1905
- [10] Yanagihara R, Gu SH, Arai S et al. (2014) Hantaviruses: rediscovery and new beginnings. *Virus Res* 187:6–14
- [11] Weiss S, Witkowski PT, Auste B et al. (2012) Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis* 18:159–161
- [12] Holmes EC, Zhang YZ (2015) The evolution and emergence of hantaviruses. *Curr Opin Virol* 10:27–33

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Detlev Krüger
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Institut für Medizinische Virologie
Helmut-Ruska-Haus
Charitéplatz 1
D-10117 Berlin
Tel.: 030-450-525092
Fax: 030-450-525907
detlev.kruger@charite.de
<http://virologie-cm.charite.de>

AUTOREN



Boris Klempa, Patrick Heinemann, Detlev H. Krüger und Peter Witkowski (v. l. n. r.).

Am Institut für medizinische Virologie der Berliner Charité wird in der Arbeitsgruppe von Detlev H. Krüger an Themen wie der Molekularen Epidemiologie und Pathogenesemechanismen von Hantaviren gearbeitet. Das hier angesiedelte Nationale Konsiliarlaboratorium für Hantaviren bietet spezielle Testverfahren und fachliche Beratung zu diesen Pathogenen der biologischen Risikostufe 3 an.