

## Diagnostik von zoonotischen Hantaviren bei Mensch und Maus

R. Ulrich<sup>1\*</sup>, J. Schmidt<sup>2</sup>, A. Razanskiene<sup>3</sup>, K. Tackmann<sup>1</sup>, R. Mattis<sup>1</sup>, T. Müller<sup>1</sup>,  
B. Klempa<sup>2,4</sup>, T. Jäkel<sup>5</sup>, M. Niedrig<sup>6</sup>, G. Pauli<sup>6</sup>, J. Koch<sup>6</sup>, H. Meisel<sup>2</sup>,  
D. H. Krüger<sup>2</sup> und F. J. Conraths<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie, D-16868 Wusterhausen, Deutschland; <sup>2</sup> Institut für Virologie, Charité, Campus Mitte, D-10098 Berlin, Deutschland; <sup>3</sup> Institute of Biotechnology, LT-02241 Vilnius, Lithuania; <sup>4</sup> Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, 84206 Bratislava, Slovakia; <sup>5</sup> German Technical Cooperation (GTZ), GTZ Office Bangkok, Bangkok 10110, Thailand; <sup>6</sup> Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Deutschland  
\* Tel.: 033979-80162, FAX: 033979-80222; e-mail: [rainer.ulrich@wus.bfav.de](mailto:rainer.ulrich@wus.bfav.de)

### 1. Einführung

Hantaviren bilden den separaten Genus *Hantavirus* in der Familie der Bunyaviridae. Das Genom der Hantaviren besteht aus drei Segmenten Negativstrang-RNA. Die Genomsegmente M und L kodieren die Hüllproteine G1 und G2 und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Das S-Segment kodiert das mit der viralen Nukleinsäure assoziierte Nukleokapsid (N)-Protein.

Beim Menschen können Hantavirusinfektionen zwei verschiedene Erkrankungen hervorrufen. In Abhängigkeit vom Vektor führen Infektionen in Europa und Asien zum Hämorrhagischen Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) mit einer Letalität von 0,1 - 12% und auf dem amerikanischen Kontinent zum Hantaviralen cardiopulmonalen Syndrom (HCPS) mit einer Letalität von bis zu 40%. Reservoirwirte und Überträger der Hantaviren sind persistent infizierte Nagetiere, die das Virus mit Urin, Speichel und Fäzes ausscheiden. Aus epidemiologischer Sicht ist der Mensch für Hantaviren ein Fehlwirt; nur für das hochvirulente südamerikanische Andesvirus (ANDV) gibt es Hinweise für eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung.

Bisher ist zur Immunprophylaxe von humanen Hantavirusinfektionen kein in Europa zugelassener Impfstoff verfügbar. Deshalb kommt den Maßnahmen der Expositionsprophylaxe große Bedeutung zu (siehe homepages des Instituts für Virologie: [www.charite.de/virologie/hantapraev.pdf](http://www.charite.de/virologie/hantapraev.pdf) und des Robert Koch-Instituts: [www.rki.de/INFEKT/HANTA/MBLHANTA.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/HANTA/MBLHANTA.HTM)).

### 2. Diagnostik von Hantavirusinfektionen beim Menschen

Die Diagnostik von Hantavirusinfektionen beim Menschen beruht in der Regel auf serologischen Methoden. Zum Nachweis von akuten Infektionen werden meist

IgM-ELISAs oder chromatografische Schnelltests eingesetzt. Der weitere Verlauf der Infektion kann anhand von IgM- und IgG-ELISAs dokumentiert werden. Für seroepidemiologische Untersuchungen werden oft IgG-ELISAs zum Screening und Western blot- oder Immunfluoreszenztests (IFT) zur Bestätigung verwendet. Die krankheitsverursachende Hantaviruspezies lässt sich durch serologische Typisierung im Neutralisationstest bestimmen.

Der Nachweis viraler Nukleinsäure gelingt in infizierten Patienten nur während der kurzen virämischen Phase der Infektion. Dabei hat sich der Einsatz eines immunchromatografischen Schnelltests zum Nachweis von Hantavirus-spezifischen IgM-Antikörpern als hilfreich erwiesen (Klempa et al., 2004a). In wenigen Fällen ist auch die Isolation von Hantaviren aus infizierten Patienten gelungen.

Für den serologischen Nachweis von Infektionen mit „einheimischen“ Hantaviren wurden von uns als diagnostische Antigene N-Proteine europäischer (Dobravavirus, DOBV; Puumalavirus, PUUV) und asiatischer Hantaviren (Hantaanvirus, HTNV; Seoulvirus, SEOV) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert (Dargeviciute et al., 2002; Razanskiene et al., 2004; Schmidt et al., 2004a). Für den Nachweis von Hantavirus-spezifischen Antikörpern wurden damit HTNV-, DOBV- und PUUV-IgM- und mAb-capture-IgG-ELISA-Screeningtests und IgG-Western blot-Bestätigungstests entwickelt und unter Verwendung charakterisierter anti-PUUV- und anti-DOBV-positiver Serumpanels validiert. Bei Untersuchungen von anti-DOBV-positiven Humansenen in der akuten Phase der Infektion wurde die Notwendigkeit des homologen Antigens für einen sensitiven Antikörpernachweis beobachtet (Meisel et al., unveröffentlichte Daten). Aus diesem Grunde wurden für den Nachweis von möglichen importierten Hantavirusinfektionen Tests auf der Basis Hefe-exprimierter N-Proteine amerikanischer Hantaviren (ANDV; Sin nombre Virus, SNV) etabliert (Schmidt et al., 2004b).

Zur Serotypisierung von Hantavirusinfektionen wurden Chemilumineszenz-Neutralisationstests entwickelt (Heider et al., 2001). Dabei zeigte sich, dass bei Seren aus der frühen Phase der Infektion teilweise stark kreuzreaktive virusneutralisierende Antikörper vorliegen und somit für eine serologische Typisierung Seren aus der Rekonvaleszenzphase der Infektion notwendig sind (Ulrich et al., 2004).

Auf der Basis der genannten Tests wurden seroepidemiologische Untersuchungen in Deutschland und Litauen durchgeführt (siehe 4.).

### **3. Nachweis von Hantavirusinfektionen bei Nagetierreservoirwirten**

Zum Nachweis von Hantavirusinfektionen bei Nagetieren werden serologische Methoden (ELISA, Western blot, immunchromatografische Schnelltests) und Nukleinsäure-Nachweisverfahren (RT-PCR) eingesetzt. Von uns werden für den Nachweis von Hantavirus-spezifischen Antikörpern Screening-IgG-ELISAs und zur Bestätigung Western blot-Tests unter Verwendung Hefe-exprimierter Hantavirus-N-Proteine verwendet (Schmidt et al., 2004a, 2004c). So konnten wir in Nagetieren aus Deutschland mittels der genannten Tests unter Verwendung von DOBV- und PUUV-N-Antigenen Hantavirus-spezifische Antikörper nachweisen. In einer Studie in Thailand wurden verschiedene Rattenspezies (Genera *Rattus* und *Bandicota*) mittels SEOV-IgG-ELISA und -Western blot auf das Vorhandensein von Hantavirus-spezifischen Antikörpern getestet (Schmidt et al., 2004c). Die in zwei verschiedenen *Bandicota*-Spezies nachgewiesenen Antikörper wurden durch Neutralisationstest als Infektionen mit dem HTNV/SEOV-verwandten Thailandvirus verifiziert (K. Yoshimatsu, persönliche Mitteilung).

Für den Nukleinsäurenachweis werden in der Regel RT-PCR-Verfahren verwendet, die spezifische Regionen im S- bzw. M-Genomsegment amplifizieren. Umfangreiche Untersuchungen in der Slowakei haben zum Nachweis des sympatrischen Vorkommens von zwei genetischen Linien des DOBV in Brand- und Gelbhalsmaus (*Apodemus agrarius* und *A. flavicollis*) geführt (Sibold et al., 2001; Klempa et al., 2003a). Kürzlich gelang auch die Isolation eines DOBV-Stamms (DOBV-Aa-SK) aus einer slowakischen Brandmaus (Klempa et al., 2004b).

## **4. Epidemiologische Studien**

### **4.1. Verbreitung von Hantaviren in Deutschland**

Unter Verwendung der oben genannten PUUV-, HTNV- und DOBV-IgG-ELISA und Western blot-Tests wurde eine repräsentative Seroprävalenzstudie der deutschen Normalbevölkerung (n=6537) durchgeführt. Dabei wurde eine durchschnittliche Durchseuchung von ca. 1% ermittelt, die jedoch regionale, geschlechts- und altersspezifische Unterschiede zeigt (Koch et al., in Vorbereitung; Ulrich et al., 2004). Die Serotypisierung bestätigte das bereits durch andere Untersuchungen dokumentierte Vorkommen von PUUV (Rasche et al., 2004), DOBV (Meisel et al., 1998; Sibold et al., 2001; Schütt et al., 2001, 2004) und TULV (Klempa et al., 2003b). Nach Einführung der Meldepflicht für klinisch apparente

Hantavirusinfektionen im Januar 2001 wurden jährlich etwa 200 Fälle registriert (2001: 185; 2002: 228; 2003: 143). Die Mehrzahl der gemeldeten Fälle ist auf Infektionen in Deutschland zurückzuführen, während bis zu 10% der Infektionen im Ausland erworben wurden. Die im Jahre 2002 beobachtete erhöhte Zahl von gemeldeten Infektionen ist auf ein epidemisches Geschehen auf der Schwäbischen Alb in Baden-Württemberg, einem Endemiegebiet für Hantavirusinfektionen in Deutschland, zurückzuführen (Infektionsepidemiologische Jahrbücher meldepflichtiger Erkrankungen für 2001 und 2002; siehe Ulrich et al., 2004).

Während die Verbreitung von Hantavirusinfektionen in der Bevölkerung schon recht gut dokumentiert ist, sind die Informationen zum Vorkommen von Hantaviren in Nagetierwirten bisher noch auf regional begrenzte Studien beschränkt. So stehen für das Vorkommen von PUUV in der Rötelmaus und des TULV in der Feldmaus in Deutschland bereits einige Daten zur Verfügung, während für die Verbreitung des DOBV bisher jegliche Informationen fehlen. Untersuchungen dazu sind auch insbesondere deshalb sehr interessant, weil möglicherweise in Deutschland spezifische genetische Linien dieses Virus mit geringerer Virulenz vorkommen. Aus diesem Grund haben wir mit mehreren Kooperationspartnern seroepidemiologische Studien in Deutschland begonnen.

#### **4.2. Vorkommen von Hantavirusinfektionen in Litauen**

Mit Hilfe von PUUV-, HTNV- und DOBV-mAb-capture IgG-ELISAs und Western blot-Bestätigungstests konnte von uns erstmals in Litauen das Vorkommen von humanen Hantavirusinfektionen gezeigt werden. Bei 36 von 438 Serumproben (8,2%) von Krebspatienten und 2 von 299 Proben (0,7%) von Blutspendern wurden Hantavirus-spezifische Antikörper nachgewiesen. ELISA- und Neutralisationstest-Untersuchungen an diesen Serumpanseln zeigten das Vorkommen von humanen Infektionen mit PUUV und DOBV. Die ELISA-Befunde deuteten auf eine mögliche Dominanz von DOBV-Infektionen hin. In allen 7 von uns untersuchten (von insgesamt 10) Bezirken Litauens wurden Personen mit Hantavirus-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Sandmann et al., 2004).

#### **5. Ausblick**

In Mitteleuropa sind bisher nur milde bis moderate klinische Verläufe von Hantavirusinfektionen beobachtet worden, die durch PUUV, DOBV und, in seltenen

Fällen, TULV verursacht wurden. Intensive Untersuchungen, insbesondere in Skandinavien, haben für PUUV eine sehr geringe Letalität (ca. 0,1%) gezeigt. Für das TULV, das bisher als nicht humanpathogen angesehen worden ist (Kraus et al., 2004), gibt es bisher lediglich zwei Fälle, bei denen dieses Virus an der Ausbildung einer unspezifischen oder Hantavirus-typischen Symptomatik beteiligt war (Klempa et al., 2003). Da auf dem Balkan bei DOBV-Infektionen schwere Verläufe des HFPS (Letalität bis 12%) beobachtet worden sind, wurde als Arbeitshypothese formuliert, dass möglicherweise eine genetische Linie des DOBV, die von der Brandmaus *Apodemus agrarius* (DOBV-Aa) übertragen wird, für die in Mitteleuropa beobachteten milden bis moderaten klinischen Verläufe von DOBV-Infektionen verantwortlich ist (Plyusnin et al., 2001; Schütt et al. 2001; Krüger et al., 2002; Ulrich et al., 2002). In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wurde kürzlich von einem DOBV-infizierten Patienten die erste Hantavirus-Nukleotidsequenz erhalten, die sehr stark mit DOBV-Aa verwandt ist (Klempa et al., 2004). Die genannte Arbeitshypothese könnte möglicherweise eine Erklärung für die geringe Zahl klinisch apparenter, als Hantavirusinfektionen diagnostizierter Fälle in Deutschland und die bisher fehlende Beschreibung klinischer Fälle in Litauen darstellen. Andererseits kann die genannte Arbeitshypothese den Nachweis von anti-HTNV/DOBV-spezifischen Antikörpern bei Personen, die außerhalb des Verbreitungsgebiets der Brandmaus in Deutschland leben, bisher nicht ausreichend erklären. Außerdem ist z.B. in der Slowakei ein sympatrisches Auftreten von DOBV-Aa und DOBV-Af beobachtet worden (Klempa et al., 2003a). Aus diesen Gründen sind umfangreiche weiterführende interdisziplinäre, insbesondere molekularepidemiologische, Untersuchungen bei Hantavirus-infizierten Patienten notwendig, um die Arbeitshypothese zu überprüfen und gegebenenfalls zu modifizieren (z.B. durch Einbeziehung der Rolle von bestimmten HLA-Typen der infizierten Patienten) oder zu verwerfen und durch eine neue zu ersetzen. Zur Klärung dieser Fragen können auch molekulargenetische Untersuchungen bei potentiellen Reservoirwirten beitragen. Weiterführend ist deshalb auch die Etablierung eines Netzwerks zum Monitoring von Hantavirusinfektionen bei potentiellen Nagetierwirten als Infektionsquelle für Hantaviren vorgesehen, um das gegenwärtige und mögliche zukünftige Infektionsrisiko der Bevölkerung einschätzen zu können.

## 6. Danksagung

Die Untersuchungen wurden von einer Reihe von Kollegen in Deutschland unterstützt, von denen hier Stefanie Sandmann, Burkhard Jandrig, Andreas Marg, Brita Auste, Anne Wolbert, Heike Lerch, Beate Becker-Ziaja, Brigitte Pohl, Anna Hegele, Karin Dauer (Berlin), Morten Schütt (Lübeck), Andreas Kunz (Reutlingen), Matthias Wenk (Eberswalde) und Ulrich Löschner (Wusterhausen) genannt seien. Die Studien wurden zum Teil in enger Kooperation mit Partnern in Vilnius, Litauen (Kestutis Sasnauskas, Aurelija Zvirbliene, Rasa Petraityte), Sapporo, Japan (Jiro Arikawa, Kumiko Yoshimatsu), Bangkok, Thailand (Yuvaluk Khoprasert), Riga, Lettland (Tatyana Voronkova, Andris Kazaks), Buenos Aires, Argentinien (Paula Padula), Albuquerque, USA (Brian Hjelle), Santiago, Chile (Pablo C. Vial) und Stockholm, Schweden (Åke Lundkvist) durchgeführt.

Finanziell wurden die Untersuchungen durch die Europäische Union, das Bundesministerium für Forschung und Technologie/ Internationales Büro der DLR und die Charité, Berlin unterstützt.

## 7. Literaturverzeichnis

Dargeviciute, A., Brus Sjölander, K., Sasnauskas, K., Krüger, D.H., Meisel, H., Ulrich, R. and Lundkvist, Å. (2002). Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. **Vaccine** 20, 3523-3531.

Heider, H., Ziaja, B., Priemer, C., Lundkvist, Å., Neyts, J., Krüger, D.H. and Ulrich, R. (2001). A chemiluminescence detection method of hantaviral antigens in neutralisation assays and inhibitor studies. **J. Virol. Methods** 96, 17-23.

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001; Robert Koch-Institut, Berlin, 2002, S.61-63

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002; Robert Koch-Institut, Berlin, 2003, S.65-68

Klempa, B., Schmidt, H.A., Ulrich, R., Kaluz, S., Labuda, M., Meisel, H., Hjelle, B. and Krüger, D.H. (2003a). Genetic interaction between distinct Dobrava hantavirus subtypes in *Apodemus agrarius* and *A. flavicollis* in nature. **J. Virol.** 77, 804-809.

Klempa, B., Meisel, H., Räth, S., Bartel, J., Ulrich, R. and Krüger, D.H. (2003b). Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula virus circulates. **J. Clin. Microbiol.** 41, 4894-4897.

Klempa, B., Schütt, M., Auste, B., Ulrich, R., Meisel, H. and Krüger, D.H. (2004a). First molecular identification of human Dobrava virus infection in Central Europe. **J. Clin. Microbiol.** 42, 1322-1325.

Klempa, B., Stanko, M., Labuda, M., Ulrich, R., Meisel, H., Krüger, D.H. (2004b). Dobrava hantavirus in Central Europe: Characterisation of the virus isolate from striped field mouse (*Apodemus agrarius*) captured in Slovakia. Abstr. 6<sup>th</sup> International Conference on HFRS, HPS and hantaviruses, Seoul, Korea, p. 102

Kraus, A.A., Raftery, M.J., Giese, T., Ulrich, R., Zawatzky, R., Hippenstiel, S., Suttorp, N., Krüger, D.H. and Schönrich, G. (2004). Differential antiviral response of endothelial cells after infection with pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. **J. Virol.** 78, 6143-6150.

Krüger, D.H., Ulrich, R. and Lundkvist, Å. (2001). Hantavirus infections and their prevention. **Microbes Infect.** 3, 1129-1144.

Krüger, D.H., Ulrich, R., Schütt, M. and Meisel, H. (2002). „Emerging viruses“: Hantavirus-Infektionen als Ursache des akuten Nierenversagens. **Deutsches Ärzteblatt** 99, A645-651.

Meisel, H., Lundkvist, Å., Gantzer, K., Bär, W., Sibold, C., and Krüger, D.H. (1998). First case of infection with hantavirus Dobrava in Germany. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 17, 884-885.

Plyusnin, A., Krüger, D.H., Lundkvist, Å. (2001). Hantavirus infections in Europe. **Adv. Virus Res.** 57, 105-136.

Rasche, F.M., Uhel, B., Ulrich, R., Krüger, D.H., Karges, W., Czock, D., Hampl, W., Keller, F., Meisel, H. and von Müller, L. (2004). Thrombocytopenia is a predictor for acute renal failure in Puumala hantavirus infections. **Emerg. Infect. Dis.** 10, 1420-1425.

Razanskiene, A., Schmidt, J., Geldmacher, A., Ritz, A., Niedrig, M., Lundkvist, Å., Krüger, D.H., Meisel, H., Sasnauskas, K., and Ulrich R. (2004). High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.** 111, 319-333.

Sandmann, S., Meisel, H., Razanskiene, A., Wolbert, A., Pohl, B., Krüger, D.H., Sasnauskas, K., and Ulrich, R. (2004). Detection of human hantavirus infections in Lithuania. **Infection** (im Druck).

Schmidt, J., Jandrig, B., Klempa, B., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Meisel, H., Niedrig, M., Pitra, C., Krüger, D.H. and Ulrich, R. (2004a). Nucleocapsid protein of cell culture-adapted Seoul virus strain 80-39: Analysis of its encoding sequence, expression in yeast and immuno-reactivity. **Virus Genes** 30 (im Druck).

Schmidt, J., Meisel, H., Hjelle, B., Capria, S.G., Vial, P.A., Padula, P., Krüger, D.H., and Ulrich, R. (2004b). Development and evaluation of serological assays for the detection of human infections by New World hantaviruses imported to Europe. Abstr. 6<sup>th</sup> International Conference on HFRS, HPS and hantaviruses, Seoul, S. 123.

Schmidt, J., Jandrig, B., Khoprasert, Y., Klempa, B., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Meisel, H., Niedrig, M., Krüger, D.H., Jäkel, T. And Ulrich, R. (2004c). Detection of hantavirus-reactive sera in wild-trapped rodents from Thailand by newly developed immunological assays based on yeast-expressed Seoul virus nucleocapsid protein. Abstr. 6<sup>th</sup> International Conference on HFRS, HPS and hantaviruses, Seoul, S. 134.

Schütt, M., Gerke, P., Meisel, H., Ulrich, R., and Krüger, D.H. (2001). Clinical characterization of Dobrava hantavirus infections in Germany. **Clin. Nephrol.** 55, 371-374.

Schütt, M., Meisel, H., Krüger, D.H., Ulrich, R., Dalhoff, K. and Dodt, C. (2004). Life-threatening Dobrava hantavirus infection with unusually extended pulmonary involvement. **Clin. Nephrol.** 62, 54-57.

Sibold, C., Ulrich, R., Labuda, M., Lundkvist, Å., Martens, H., Schütt, M., Gerke, P., Leitmeyer, K., Meisel, H. and Krüger, D.H. (2001). Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in central Europe and is carried by two different *Apodemus* mice species. **J. Med. Virol.** 63, 158-167.

Ulrich, R., Hjelle, B., Pitra, C. and Krüger, D.H. (2002). Emerging viruses: The case “Hantavirus”. **Intervirology** 45, 318-327.

Ulrich, R., Meisel, H., Koch, J., Schönrich, G., Kraus, A., Sandmann, S., Klempa, B., Geldmacher, A., Schmidt, J., Siebörger, J., Niedrig, M., Pauli, G. and Krüger, D.H. (2003). Hantaviren. Müssen wir uns in Deutschland davor fürchten? **Humboldt-Spektrum** 4, 12-18.

Ulrich, R., Meisel, H., Schütt, M., Schmidt, J., Kunz, A., Klempa, B., Niedrig, M., Kimmig, P., Pauli, G., Krüger, D.H. and Koch, J. (2004). Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland. **Bundesgesundheitsblatt** 47, 661-670.