

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Institut für Medizinische Virologie
Direktor: Prof. Dr. med. Hans W. Doerr

**NEPHROPATHIA EPIDEMICA AUSBRUCH IN
UNTERFRANKEN UND DER EIFEL:
MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR VERURSACHENDEN HANTAVIRUSSPEZIES IM
SOMMER/HERBST 2007**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe – Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Stefanie Mikolajczak
aus Aachen

Frankfurt am Main, 2009

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. H. W. Doerr
Korreferent: Prof. Dr. H. Geiger
Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2010

Summary

Human hantavirus infections have been reported in Germany since the 1980s. The virus is transmitted to humans mainly through persistently infected rodents and causes an infection called haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). Puumala virus (PUUV) is responsible for the majority of human hantavirus infections in Germany, typically causing a mild HFRS, which is referred to as nephropathia epidemica (NE). Endemic regions have been known in the Suebian Alb (Baden-Wuerttemberg) and Lower Franconia (Bavaria). Whereas in 2001-2004 and 2006 about 70-240 human cases were recorded annually in Germany, in 2005 and 2007 a dramatically increased number of human hantavirus infections, reaching 448 (2005) and 1688 (2007) cases, was observed. The most affected regions were located in the regions of the Bavarian Forest, the Suebian Alb, the Spessart, Münsterland and North Rhine Westphalia. To determine the reservoir responsible for the infections, in our study a total of 108 rodents were trapped in Lower Franconia and the Eifel. Serologic and genetic investigations confirmed that Puumala virus (PUUV) is dominant in the local population of bank voles. Another objective of this study was to detect and characterize the hantavirus strain responsible for the increased number of NE cases in Lower Franconia and the Eifel. Partial PUUV-S-segment nucleotide sequences originating from bank voles at trapping sites within one region showed a low divergence (up to 6%). This is contrasted by a nucleotide sequence divergence of 17–18% to PUUV strains detected in Belgium and Sweden. Interestingly, the sequences from Lower Franconia (*Laufach*) also differ clearly from other German sequences like *Bavaria* (divergence of 9%) and represent a new PUUV subtype which seems to be responsible for the observed increase of human hantavirus infections in 2007.

Zusammenfassung

In Deutschland sind humane Hantavirusinfektionen bereits seit den 1980er Jahren bekannt. Hantaviren werden von persistent infizierten Nagetieren auf den Menschen übertragen und verursachen das Hämorrhagische Fieber mit Renalem Syndrom (HFRS). Das Puumala Virus (PUUV) ist für die Mehrzahl der Hantavirusinfektionen in Deutschland verantwortlich und verursacht eine mildere Form des HFRS, die als Nephropathia Epidemica (NE) bezeichnet wird. Bekannte Endemiegebiete sind die Schwäbische Alb (Baden-Württemberg) und Unterfranken (Bayern). Während in den Jahren 2001–2004 und 2006 die Zahl der registrierten Fälle in Deutschland bei 70-240 lag, gab es in den Jahren 2005 und 2007 einen dramatischen Anstieg der Hantavirusinfektionen auf 448 (2005) und 1688 (2007) Fälle. Die am meisten betroffenen Regionen lagen in den Gebieten Bayerischer Wald, Schwäbische Alb, Spessart, dem Münsterland sowie im Süden und Westen Deutschlands. Um die verursachende Mäusespezies zu identifizieren, wurden im Rahmen unserer Studie 108 Kleinsäuger in Unterfranken und der Eifel gefangen. Durch serologische und genetische Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass das PUUV in den untersuchten Nagetierpopulationen das dominante Virus darstellt. Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, die RNA-Sequenzen der Hantaviren zu identifizieren und zu charakterisieren, die für die zunehmende Zahl der Infektionen mit „Nephropathia epidemica“ in Unterfranken und der Eifel verantwortlich waren. Es zeigt sich, dass PUUV-S-Segment-Sequenzen von Nagetieren aus einer Region nur geringe Divergenzen untereinander zeigen (bis zu 6%). Im Gegensatz dazu weisen die untersuchten Sequenzen eine hohe Divergenz von 17-18% zu Sequenzen aus Belgien oder Schweden auf. Interessanterweise unterscheiden sich die identifizierten Sequenzen aus Unterfranken (*Laufach*) auch deutlich von anderen deutschen Sequenzen wie zum Beispiel Sequenzen aus Bayern (Divergenz von 9%). Die identifizierten Sequenzen clustern somit deutlich als eigene PUUV-Sublinie, die wahrscheinlich für den massiven Anstieg der Hantavirusinfektionen im Jahr 2007 verantwortlich war.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	01
1.1	Historischer Überblick	01
1.2	Struktur der Hantaviren	03
1.3	Klinischer Verlauf	05
1.3.1	Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) und Nephropathia Epidemica (NE)	05
1.3.2	Hantavirales Kardiopulmonales Syndrom (HCPS)	07
1.4	Prävention	09
1.5	Diagnostik von Hantavirus-Infektionen	09
1.6	Übertragungswege und Übersicht über die weltweite Verbreitung von Hantaviren	10
1.7	Epidemiologie in Deutschland	14
1.8	Zielsetzung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material.....	17
2.2.1	Chemikalien	17
2.1.2	Puffer und Lösungen	18
2.1.2.1	Hefeanzucht	18
2.1.2.2	Proteinaufreinigung	19
2.1.2.3	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot	19
2.1.2.4	Enzymimmunoassay (EIA)	20
2.1.2.5	Polymerase-Kettenreaktion/Sequenzierung	20
2.1.3	Spezielle Geräte	21
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.5	Kits	22
2.1.6	Biologische Materialien	22
2.1.6.1	Hefestämme	22
2.1.6.2	Plasmide	22
2.1.7	Antikörper	23
2.1.8	Primer	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Mäusefang und Sektionen	25
2.2.2	Proteinaufreinigung	29
2.2.2.1	Transformation und Anzucht der Hefe-Klone	29
2.2.2.2	Lyse der Hefe-Zellen	30
2.2.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page), Western Blot	30
2.2.4	EIA, Immunoblot	31
2.2.5	RNS-Isolierung aus Gewebeproben der Lunge	33
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.6.1	RT-PCR	34
2.2.6.2	Nested PCR vom S-Segment	35
2.2.6.3	PCR des partialen M-Segmentes	35
2.2.7	Nachweis der Amplifikate im Agarosege	36
2.2.8	Cycle Sequencing und Aufreinigung	36
2.2.9	Digitalisierung und phylogenetische Analyse	37

3	ERGEBNISSE	38
3.1	Mäusefang und Sektionen	38
3.2	Herstellung und Charakterisierung von hefeexprimierten Hantavirus- Nukleokapsidproteinen	39
3.3	Nachweis von hantavirusspezifischen Antikörpern im Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (EIT)	40
3.4	Ergebnisse der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .	41
3.5	Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse der S- sowie der M- Segmente	45
	3.5.1 Analyse der PUUV-S-Segment-Sequenzen	45
	3.5.2 Analyse der PUUV-M-Segment-Sequenzen	47
3.6	Epidemiologische Auswertung der an Hantavirus erkrankten Personen in den Landkreisen Aschaffenburg und Main-Spessart	49
4	DISKUSSION	51
4.1	Die zunehmende Bedeutung von Hantaviren in Deutschland	51
4.2	Puu-Viren als auslösendes Agens für den Ausbruch im Jahr 2007	52
4.3	Ursachen für spill over-Infektionen	52
4.4	Korreliert die Seroprävalenz von Hantaviren in Reservoirwirten mit der Zahl der humanen Hantavirus-Infektionen?	53
4.5	Die untersuchten Sequenzen clustern deutlich als eigene Sublinien	54
	4.5.1 Ähnlichkeiten zwischen Sequenzen aus geographisch benachbarten Fangorten	54
	4.5.2 Unterschiede von Hantavirus-Sequenzen zwischen verschiedenen Fangorten	55
4.6	Ursachen für die massive Zunahme der Hantavirusinfektionen im Jahr 2007	56
	4.6.1 Ursachen in der Nagetierpopulation	56
	4.6.2 Risikoverhalten bei den Menschen	56
4.7	Zusammenfassung und Ausblick	57
5	LITERATURVERZEICHNIS	59
6	DANKSAGUNG	70
7	ERKLÄRUNG	71
8	LEBENS LAUF	72

Einleitung

1.1 Historischer Überblick

Bereits aus dem Jahr 960 n. Chr. existiert ein Bericht aus China über ein Krankheitsbild, das die typischen Symptome einer Hantavirusinfektion zeigt (Johnson, 2001). Auch in den folgenden Jahrhunderten trat bei diversen kriegerischen Auseinandersetzungen unter Soldaten immer wieder eine fiebrige Erkrankung auf, die mit hämorrhagischen Komplikationen und Nierenversagen assoziiert war. Im ersten Weltkrieg wurden sowohl die alliierten als auch die deutschen Truppen von einer „Feldnephritis“ heimgesucht, bei der es sich ebenfalls um eine Hantavirusinfektion gehandelt haben könnte (Cameron, 2001). Auffällig war, dass sich die betroffenen Soldaten viel im Unterholz oder im Wald aufgehalten hatten. 1934 wurde in Schweden erstmals eine Krankheit beschrieben, die mit vorwiegend renaler Beteiligung einherging und somit das typische Bild einer milden, hantaviralen Infektion zeigt (Clement, 1997). Im Koreakrieg von 1950–1953 erkrankten 3000 Soldaten der Vereinten Nationen an dem so genannten „Koreanischen Hämorrhagischen Fieber“ (KHF), die Letalität lag bei 10–15%. Daraufhin begann noch in den 1950er Jahren die Suche nach dem Erreger dieser Krankheit, der jedoch zunächst unbekannt blieb. 1978 gelang es dem Südkoreaner Ho Lee Wang, das erste Hantavirus aus der Lunge einer Brandmaus (*Apodemus agrarius*) zu isolieren (Lee et al., 1978). Er benannte das Virus nach dem Han-Fluss in Korea, in dessen Nähe die Brandmaus gefangen wurde und die ersten KHF Fälle beschrieben worden waren.

Kurz darauf wurde herausgefunden, dass das auslösende Agens für das mildere, KHF-ähnliche Krankheitsbild in Skandinavien ebenfalls ein Hantavirus war und von der Rötelmaus (*Myodes glareolus*) übertragen wurde. Es wurde nach der kleinen finnischen Stadt „Puumala“ benannt (Brummer-Korvenkontio et al., 1980). 1982 gelang es zwei amerikanischen Forschungsgruppen gleichzeitig, ein Hantavirus elektronenoptisch darzustellen (McCormick et al., 1982; White et al., 1982). Sie fanden heraus, dass die Hantaviren zur Familie der *Bunyaviridae* gehören und somit die ersten, nicht von Arthropoden übertragenen Bunyaviren sind. Auf Vorschlag der WHO wurden 1983 die typischen Krankheitsbilder unter dem Sammelbegriff „Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom“ (HFRS) offiziell zusammengefasst und „Hantavirus“ als Genus für das auslösende Virus festgelegt (WHO, 1983). Die ersten Hinweise für

Hantavirusinfektionen in Deutschland gab es beim Militär in Ulm 1984 (Pilaski et al., 1991, 1994; Clement J., 1996). Im Mai des Jahres 1993 erkrankten im Südwesten der USA junge, ansonsten gesunde Personen an einem akuten Atemnotsyndrom (ARDS). Die betroffene Region war das Vierländereck, das durch die Bundesstaaten Arizona, Colorado, New Mexico und Utah (Four-Corners-Region) gebildet wird. Die Patienten litten an hohem Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen. Hinzu kam eine pulmonale Insuffizienz, die in einigen Fällen durch einen kardiogenen Schock zum Tode führte. Serologische Untersuchungen und molekulargenetische Analysen führten zur Entdeckung des Sin-Nombre-Virus (SNV), das von der Hirschmaus (*Peromyscus maniculatus*) übertragen wird (Nichol et al., 1993). Aufgrund der schwerwiegenden Atemprobleme der Patienten wurde die Erkrankung zunächst als „Hantavirales Pulmonales Syndrom“ (HPS) bezeichnet. Heute ist die Krankheit unter dem Namen „Hantavirales Kardiopulmonales Syndrom“ (HCPS) bekannt.

In der Folgezeit wurden noch weitere Neuwelt – Hantaviren sowohl in Nordamerika als auch in Süd- und Mittelamerika identifiziert, die sich alle durch eine sehr hohe Letalität von ca. 40% auszeichnen. Inzwischen umfasst der Genus Hantavirus 22 Virus-Spezies, die grob in Altwelt- und Neuwelt-Hantaviren unterteilt werden. Im Jahr 2006 wurden Hantaviren in afrikanischen Mäusen (*Hylomyscus simus*) in Guinea entdeckt (Klempa et al., 2006), wodurch zum ersten Mal gezeigt wurde, dass Hantaviren auch auf dem afrikanischen Kontinent zu finden sind. Ebenfalls in den letzten Jahren wurden neue Hantaviren in Spitzmäusen gefunden. Bis vor kurzem war das Thottapalayamvirus (TPMV), das aus einer Moschusspitzmaus (*Suncus murinus*) in Indien isoliert worden war, der einzige Hinweis darauf, dass Nagetiere nicht die einzigen Wirte für Hantaviren sein könnten (Carey et al., 1971, Song et al., 2007)). Im letzten Jahr jedoch wurden weltweit weitere Hantaviren in Insektivoren, wie zum Beispiel den Weißzahnspitzmäusen in Guinea (*Crocidura theresae*) (Klempa et al., 2007) und Südkorea (*Crocidura lasiura*), gefunden (Song und Yanagihara, unveröffentlichte Daten). Auch in einer nördlichen Kurzschwanzspitzmaus (*Blarina brevicauda*) aus den USA (Arai et al., 2007) und einer chinesischen Stummelschwanzspitzmaus (*Anourosorex squamipes*) wurden neuartige Hantaviren entdeckt (Song et al., 2007). Jedoch ist bisher erst wenig über die Humanpathogenität von Hantaviren in Spitzmäusen bekannt

1.2 Struktur der Hantaviren

Hantaviren gehören zur Familie der *Bunyaviridae* und bilden dort ein separates Genus. Es sind behüllte Viren mit einer Größe von 90-120 nm und einem segmentierten Negativstrang-RNA Genom. Im Jahr 1983 fand C. Schmaljohn heraus, dass das Genom dreigeteilt ist und aus einem kleinen, einem mittleren und einem großen Segment besteht (Schmaljohn and Dalrymple, 1983). Die drei Genomsegmente wurden entsprechend ihrer Größe S-(small), M-(medium) und L-(large) benannt und sind mit dem Nukleokapsidprotein (N-Protein) assoziiert. Das S-Segment besteht aus 1,8-2,1 Kilo-Basenpaaren (kb), das M-Segment aus 3,7-3,8 kb und das L-Segment aus 6,5-6,6 kb (siehe Abbildung 2). Das kleinste Genomsegment kodiert für das N-Protein und das größte Segment kodiert für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase, die sich ebenfalls im Virion befindet. In die umgebende Wirtszell-abgeleitete Lipidhülle sind Glykoproteine eingelagert, die vom viralen M-Genomsegment kodiert werden (siehe Abbildung 1). Sie sind wahrscheinlich maßgeblich an der Adsorption des Virus an die Wirtszellen beteiligt, indem sie sich an $\beta 1$ und $\beta 3$ -Integrin-Rezeptoren an der Oberfläche von Körperzellen binden können. Die Zellen, die $\beta 3$ -Integrin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, sind Makrophagen, Blutplättchen und Endothelzellen und spielen unter anderem eine Rolle bei der Regulation von Gefäßpermeabilität und der Plättchenfunktion. Durch die Aktivierung dieser Zellen kann es durch verschiedene Reaktionskaskaden erstens zu einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit mit anschließender Hypotension kommen und zweitens durch die veränderte Plättchenfunktion zu Hämorrhagien (Mackow et.al., 2001).

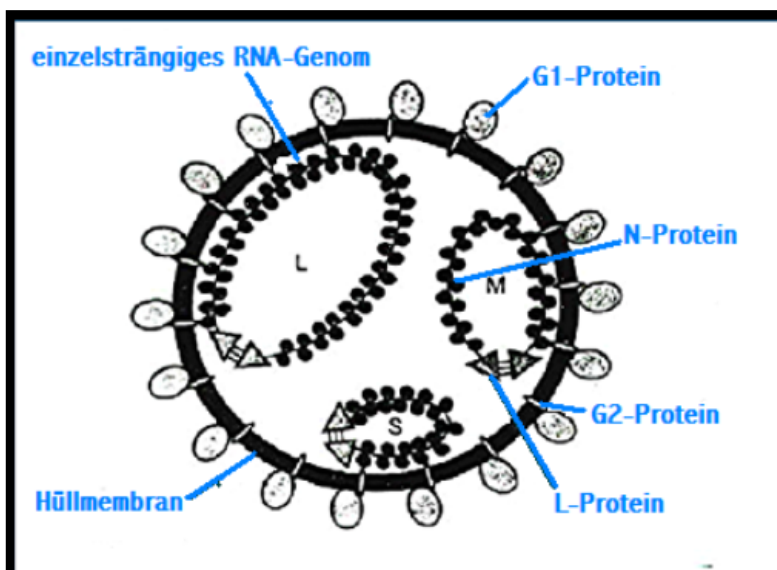


Abbildung 1:
Schematischer Aufbau
eines Hantavirus

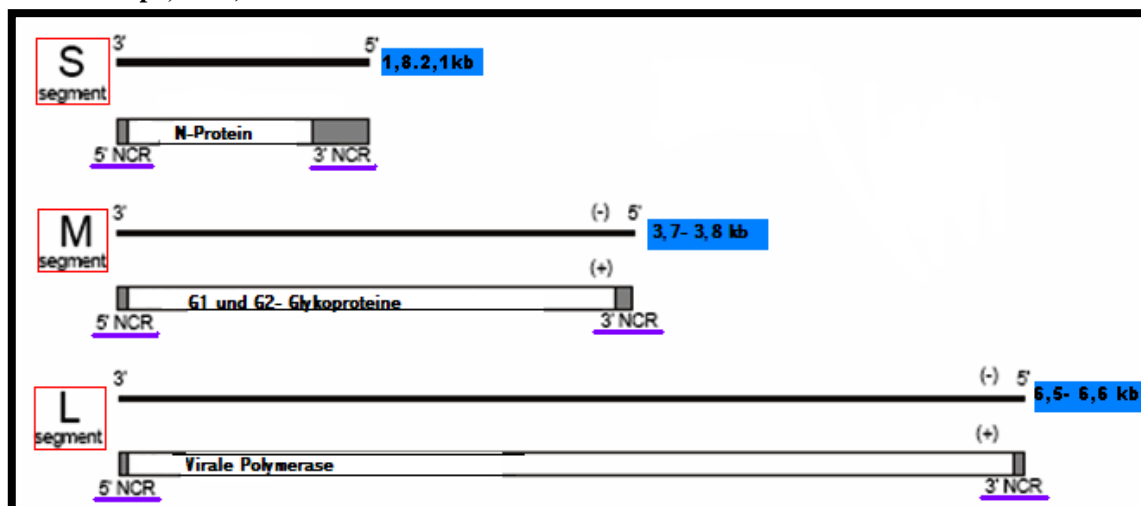
L-Protein: virale RNA-Polymerase.

S (small), M (medium) und L (large) sind die drei einzelsträngigen, ringförmigen RNA-Segmente. In die Hüllmembran sind Glykoproteine eingelagert (G1 und G2).
(Modifiziert nach Sandmann)

Durch Sequenzierungen der Genomsegmente von unterschiedlichen Hantaviruspezies konnte gezeigt werden, dass die S-Segmente den variabelsten Abschnitt des Virusgenoms darstellen. Diese Variabilität tritt vorwiegend in der 3'-nicht-kodierenden Region (non-coding-region, NCR) auf (Plyusnin et al., 1996). Am höchsten konserviert hingegen sind die Polymerase kodierenden L-Segmente (Xiao et al., 1994; Plyusnin et al., 1996; Antic et al., 1992). Für die Mitglieder der Familie der *Bunyaviridae* ist ferner auffällig, dass an allen segmentterminalen Enden jeweils typische, nahezu komplementäre Basensequenzen vorliegen. Diese sogenannten Panhandle- oder Konsensus-Sequenzen bewirken, dass sich die einzelnen RNA-Segmente nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung mit den Enden verbinden und ringartige Strukturen ausbilden können (Schmaljohn et al., 1986). Die Nukleotidsequenzen AUCAUCAUCUG am 3'-Ende und UAGUAGUA am 5'-Ende der L-, M-, und S-Segmente sind charakteristisch für die Hantaviren.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Genomsegmente eines Hantavirus

Dargestellt sind die drei verschiedenen Genomsegmente mit ihren unterschiedlichen Längen (kb=Kilo-Basenpaar), ihre Genprodukte sowie die nicht-kodierenden Regionen (NCR). (Modifiziert nach Klempa, 2004)



1.3 Klinischer Verlauf

Hantavirus-Infektionen können zwei unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen. Das Hämorrhagische Fieber mit Renalem Syndrom (HFRS) und das Hantavirale Kardiopulmonale Syndrom (HCPS). Die Art und Schwere des klinischen Verlaufes reicht von klinisch unauffälligen oder grippeähnlichen Infektionen bis hin zu letalen Verläufen und wird maßgeblich durch die Hantavirus-Spezies bestimmt.

1.3.1 Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) und Nephropathia Epidemica (NE)

In der Familie der Hantaviren gibt es vier Spezies, die HFRS verursachen: HTNV und SEOV in Asien und DOBV und PUUV in Europa. Abhängig von der auslösenden Virusspezies kann sich das HFRS klinisch in unterschiedlicher Schwere manifestieren. Schwere klinische Verläufe können sich bei DOBV (Letalität 7-12%) sowie bei HTNV (Letalität 5-10%) zeigen, wohingegen das SEOV einen milderen Verlauf nimmt und nur in einem Prozent der Fälle letal verläuft. Das PUUV verursacht ebenfalls eine mildere Form des HFRS, die als Nephropathia Epidemica (NE) bezeichnet wird, da sie insbesondere mit einer Nierenschädigung einhergeht (Letalität 0,1%).

Die Krankheit kann in fünf Phasen eingeteilt werden. Diese Phasen können je nach Erreger und Abwehrsituation der erkrankten Person in ihrer Ausprägung variieren, es kann auch eine Phase völlig fehlen (Schmaljohn et al., 1997).

Diese fünf Phasen sind:

1. Febrile Phase
2. Hypotensive Phase
3. Oligurische Phase
4. Polyurische Phase
5. Rekonvaleszenzphase

Nach einer Inkubationszeit von etwa 2-5 Wochen beginnt die Krankheit meist mit grippeähnlichen Symptomen wie Kopfschmerzen, hohem Fieber sowie Zeichen eines allgemeinen grippalen Infektes. Zusätzlich zu den grippeähnlichen Symptomen können auch konjunktivale Infektionen, Exantheme und abdominelle Beschwerden auftreten. Nach ca. 3-5 Tagen geht diese „febril“ genannte Phase durch eine Proteinurie in die hypotensive Phase über. Der Blutdruck kann stark sinken und zu kollaptischen Zuständen oder einer Schocksymptomatik führen, was vermutlich auf eine erhöhte

Gefäßpermeabilität zurückzuführen ist (Khaiboullina et al., 2002; Linderholm, 2001, Cosgriff, 1991). Inflammatorische Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die von aktivierten Makrophagen freigesetzt werden, provozieren eine Gefäßdilataion und führen somit zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße (Kanerva et al., 1998). Laborchemisch können außerdem eine Thrombozytopenie, eine Leukozytose sowie ein erhöhter Hämatokritwert diagnostiziert werden. Weiterhin fällt die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ab, wodurch die anschließende oligurische Phase eingeleitet wird. Die Störung der Nierenfunktion ist in dieser Phase oft sehr ausgeprägt, sodass bei schweren Verläufen eine Dialysetherapie erforderlich sein kann. Die Hälfte aller Todesfälle treten in dieser Phase auf, die ca. 2-5 Tage andauert.

Durch Nierenbiopsien konnte herausgefunden werden, dass die Degeneration von tubulären Epithelzellen sowie interstitiellen Ödemen die Funktion der Nieren herabsetzen. Außerdem kommt es durch eine Infiltration von roten Blutkörperchen und Leukozyten zu einer Schädigung der Niere (Lähdevirta et al; 1971). Wenn die oligurische Phase abgeschlossen ist, normalisiert sich die Nierenfunktion in der polyurischen Phase. Es werden drei bis sechs Liter pro Tag ausgeschieden, wobei die tägliche Urinmenge und die Dauer der Diurese mit der Schwere der vorangegangenen Symptome korrelieren. Die anschließende Rekonvaleszenzphase bis zum Erreichen einer normalen Nierenfunktion kann Wochen bis Monate dauern, bis im Normalfall eine „*restitutio ad integrum*“, eine völlige Heilung, erreicht wird (Hjelle et al., 1995; Lee et al., 1996).

Symptom	Puumala	Dobrava
Fieber	97-100	84-100
Kopfschmerzen	62-90	62-75
Bauchschmerzen	64-75	74-85
Rückenschmerzen	63-82	59-84
Übelkeit/Erbrechen	33-83	50-85
Schwindel	12-25	30
Petechien	12	59
Konjunktivale Infektion	14	50-63
Hämorrhagien	2	9-26
Hypotension (<90/60mmHg)	1-2	44-49
Myopie	10-36	42-62
Oligurie < 0,5l/d	54-70	47-78
Polyurie > 2 l/d	97-100	75
Leukozytose >10x10hoch9/L	23-57	44-53
Thrombozytopenie	56-68	78
Proteinurie	84-100	94-100
Hämaturie	58-85	100
Serum Kreatinin >150µmol/L	90	94-100
Dialyse	5-7	30-47
Tod	0	9-12

Die Therapie erfolgt in schweren Fällen mittels einer Hämodialyse, ansonsten werden die Patienten symptomatisch versorgt (Pei-Wen Tai et al., 2005). Im Falle der Nephropathia epidemica werden nur wenige Patienten dialysepflichtig, da die Krankheit insgesamt milde verläuft. Jedoch kommt es bei ca. einem Prozent der Patienten zusätzlich zu neurologischen Symptomen wie Blasenparalysen und Krampfanfällen (Muranyi et al., 2005).

Tabelle 1:
Übersicht über die verschiedenen Symptome bei einer Infektion mit PUUV/DOBV (Modifiziert nach Vapalahti, 2003)

1.3.2 Hantavirales Kardiopulmonales Syndrom (HCPS)

Das Hantavirale Kardiopulmonale Syndrom tritt hauptsächlich in Nord- und Südamerika auf. Es wird in den USA und Kanada durch das Sin Nombre Virus ausgelöst (Duchin et al. 1994), wohingegen es in Argentinien und Chile durch das Andes Virus (ANDV) hervorgerufen wird. Der Krankheitsverlauf zeigt eine schnellere Progression als der des oben beschriebenen HFRS. Schon innerhalb der ersten 24 Stunden können die Patienten durch kardiologische oder respiratorische Symptome beatmungspflichtig werden. Auch das HCPS wird in Phasen eingeteilt:

1. Febrile Phase
2. Kardiopulmonale Phase
3. Diuretische Phase
4. Rekonvaleszenzphase

Die febrile Phase beginnt nach einer Inkubationszeit von 1-5 Wochen mit Fieber, Myalgien, Kopfschmerzen und gastrointestinalen Symptomen. Die kritische kardiopulmonale Phase, die durch einen schnell eintretenden hypovolämischen Schock und Atemprobleme gekennzeichnet ist, folgt nach drei bis fünf Tagen und kann bis zum Delirium führen. Zu einer Hypovolämie kommt es, da T-Zellen das Endothel der Pulmonalgefäße angreifen und Entzündungsprozesse induzieren. Dadurch freigesetzte γ -Interferone und Tumornekrosefaktoren führen zu einer erhöhten vaskulären Durchlässigkeit (Peters et al., 1999). Proteine treten aus dem Blut ins Lungeninterstitium aus, wodurch pulmonale Ödeme und Pleuraergüsse entstehen können. Das Lungenödem verursacht Dyspnoe, trockenen Husten und Sauerstoffsättigungswerte von unter 95%. Durch eine Kombination mit einer fortschreitenden Herzinsuffizienz können diese Symptome innerhalb von 24–48 Stunden zum Tod führen.

Die Laborbefunde zeigen beim HCPS häufig eine Thrombozytopenie (unter 100.000/l), eine erhöhte Zahl von aktivierten Lymphozyten und eine Linksverschiebung. Außerdem treten in 25% der Fälle Blutungen in der Mukosa des Magens auf (Zaki et al., 1995), wohingegen die Nieren beim HCPS im Gegensatz zum HFRS meist intakt bleiben. Differentialdiagnostisch muss aufgrund der Bauchschmerzen an eine Appendizitis, an Abszesse oder auch an gynäkologische Erkrankungen gedacht werden. Durch die kardiovaskulären Symptome bedingt muss auch eine Sepsis ausgeschlossen werden (Enria et al., 2001).

Eine spontane Diurese ist ein frühes Zeichen der diuretischen Phase, in der eine schnelle Besserung der Ödeme sowie das Abklingen von Fieber und Schock eintreten. Die Rekonvaleszenzphase kann wie beim HFRS Wochen bis Monate dauern. Auch beim HCPS erfolgt die Therapie symptomatisch. Durch intensivmedizinische Betreuung und maschinelle Beatmung versucht man die Blutungen und das ARDS zu therapieren und den Kreislauf zu stabilisieren.

1.4 Prävention

Eine wichtige Maßnahme zur Prävention von Hantavirus-Infektionen ist die Vermeidung von Kontakt mit Nagetieren und deren Ausscheidungen. Insbesondere Risikogruppen, wie zum Beispiel Forstarbeiter, müssen dies beachten. Außerdem spielt die Nagetierbekämpfung in Wohnbereichen eine wichtige Rolle. Darüber hinaus werden die Vermeidung von Staubentwicklung in kontaminierten Bereichen sowie das Tragen von Atemschutzmasken und Einweghandschuhen in Hochrisikogebieten empfohlen (RKI, 2007). Ein suffizienter Impfstoff als Prävention konnte bisher nicht entwickelt werden, obwohl an passiver Immunisierung (Xu et al., 2002) und inaktivierten Hantaviren (Cho et al., 2002; Choi et al., 2003) bereits intensiv geforscht wurde. Weitere Forschungsansätze für Impfstoffe wurden in Versuchen mit rekombinanten, hantaviralen Glykoproteinen (Schmaljohn et al., 1992) und Nukleokapsidproteinen (Lundkvist et al., 1996; Ulrich et al., 1998; Razanskiene et al., 2004) erprobt. Auch neutralisierende Antikörper gegen Hantaan-Glykoproteine wurden entwickelt (Koch et al., 2003; Liang et al., 2003). Eine der Schwierigkeiten ist, dass die Instabilität der Genomstruktur der Hantaviren laufend zu Veränderungen sowohl des Genotyps als auch des Phänotyps der Viren führt.

1.5 Diagnostik von Hantavirus – Infektionen

Da es durch die unspezifischen Frühsymptome oft schwierig ist, eine Infektion mit Hantaviren klinisch eindeutig nachzuweisen, kommt der Labordiagnostik besondere Bedeutung zu. Antikörpertiter von IgM und oft auch von IgG und IgA sind bereits in den ersten Krankheitstagen nachweisbar, da sowohl HFRS als auch HCPS immunmodulierte Krankheiten sind. Nach durchschnittlich 1-3 Monaten sind die IgM-Antikörper nicht mehr vorhanden, während die IgG-Antikörper vermutlich eine lebenslange Immunität sichern (Settergren et al., 1991; Lundkvist et al., 1993). Der übliche Weg zur Diagnostik einer Hantavirus-Infektion besteht im Nachweis von hantavirusspezifischen Antikörpern mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (EIA) (Kruger et al., 2001). Auch weitere serologische Methoden wie der Immunfluoreszenztest (IFT), Western Blot, Streifen-Immuno blot und der chromatographische Schnelltest werden in der Diagnostik eingesetzt (Zöller et al., 1993;

Hjelle et al., 1997; Schubert et al., 2001; Hujakka et al., 2003). Die hantavirusspezifischen Antikörper im Serum werden in der Regel per EIA detektiert und die Ergebnisse anschließend mit einem Immunoblot bzw. IFT bestätigt. Die serologischen Screenings werden mit rekombinant hergestellten N-Proteinen durchgeführt. Diese hefeexprimierten Nukleokapsid-Proteine können von PUUV-Vranica/Hällnas (Reip et al., 1995; Dargeviciute et al., 2002), von PUUV-Bavaria (Essbauer et al., 2006), von TULV-Moravia (Plyusnin et al., 1995) und von DOBV-Slovenia (Avsic-Zupanc et al., 1995; Razanskiene et al., 2004) hergestellt werden. Die rekombinanten Antigene (aus dem N-Protein) sind von Vorteil, da die Schwierigkeiten bei der Herstellung der diagnostischen Antigene in L-3-Laboren umgangen werden können.

Durch serologische Kreuzreaktionen ist es manchmal schwierig, die einzelnen Hantavirusinfektionen eindeutig einem Erreger zuzuordnen. Insbesondere zwischen den nahe verwandten Hantavirusspezies HTNV/DOBV/SEOV, PUUV/TULV und SNV/ANDV kommt es im EIA häufig zu den erwähnten Kreuzreaktionen. Doch auch zwischen PUUV und HTNV-Viren kommt es zu Kreuzreaktivitäten, weshalb in manchen Fällen eine HTNV-Infektion nicht sicher von einer PUUV-Infektion unterschieden werden kann (Zöller et al., 1993). Die Verwendung eines homologen Antigens wird dann notwendig, um eine höhere Sensitivität zu erzielen (Ulrich et al., 2004). Außerdem lässt sich in der Regel Virus-Nukleinsäure im Blut der Patienten nachweisen, wodurch eine Polymerase-Kettenreaktion und eine Sequenzierung möglich werden. Erst dann kann der verursachende Erreger eindeutig klassifiziert werden.

1.6 Übertragungswege und Übersicht über die weltweite Verbreitung von Hantaviren

Persistent infizierte Nagetiere und Insektenfresser stellen den Wirt der Hantaviren dar. Die infizierten Nagetiere scheiden das Virus mit Urin, Kot und Speichel aus. Durch Inhalation dieser Exkrememente oder auch durch Bisse (Schultze et al., 2003) kann eine Infektion beim Menschen hervorgerufen werden. Aus dem Übertragungsweg der Hantaviren resultieren auch die Personengruppen, die einer besonderen Infektionsgefahr unterliegen, wie zum Beispiel Waldarbeiter, Soldaten, Tierpfleger und auch Jogger. (Niklasson et al., 1992; Zöller et al., 1995). Die Mehrzahl der Kranken ist über 30 Jahre alt, aber es wurden auch schon Hantavirusinfektionen bei Kindern diagnostiziert (Van

der Werff Ten Bosch, 2004). Der Mensch ist normalerweise der Endwirt. Eine Ausnahme gab es jedoch 1996 in Argentinien, als eine Übertragung vom hochvirulenten Andes-Virus von Mensch zu Mensch stattfand (Martinez et al., 2005).

Da das Auftreten von Hantavirusinfektionen direkt mit der Größe und Dynamik der Nagetierwirt-Population zusammenhängt, kommt es zu einem zyklischen Auftreten von humanen Hantavirusinfektionen in Abhängigkeit von der Dichte und Durchseuchung der Nagetier-Populationen (Niklasson B., 1995; Hjelle B., 2000). Die Nagetiere sind persistent mit dem Virus infiziert und übertragen die Viren horizontal von Tier zu Tier über Bisse.

Phylogenetische Analysen der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Hantaviren weisen auf eine Einteilung der Hantaviren in verschiedene genetische Linien hin, die jeweils deutlich mit einem Wirt assoziiert sind (Kruger et al., 2001). Von der NE wird beispielsweise fast nur aus Ländern berichtet, in denen die Rötelmaus heimisch ist und das Sin-Nombre-Virus kommt nur auf dem amerikanischen Kontinent vor, wo die sigmodontinen Nager beheimatet sind (Childs et al., 1994; Johnson et al., 1997).

Viele Jahre waren Hantavirusinfektionen nur in Europa und Asien bekannt. Mit der Isolierung des Sin-Nombre-Virus (SNV) in Nordamerika (Nichol et al., 1993) sowie weiteren SN-ähnlichen Hantaviren in Südamerika (Hjelle et al., 1994; Wells et al., 1997; Levis et al., 1997), wurden Hantaviren zu einer weltweiten Infektionskrankheit (Schmaljohn und Hjelle, 1997). Lediglich aus Australien und Afrika liegen bisher nur wenige Daten vor (Klempa, 2006). Im ostasiatischen Raum treten Hantavirusinfektionen sehr häufig auf, insbesondere in Nordchina, wo mit bis zu 100.000 Infektionen pro Jahr mit Abstand die höchste globale Hantavirusinzidenz erreicht wurde (Kolakovsky et al., 1991).

In Europa wurden bereits aus nahezu allen Ländern Fälle von HFRS und NE berichtet. Es besteht ein Seroprävalenzgefälle, das von Nord- nach Südeuropa und von Ost- nach Westeuropa verläuft. So werden hohe Inzidenzen aus Skandinavien und vom Balkan gemeldet. PUUV ist nach bisherigem Kenntnisstand für die meisten Fälle von Hantavirusinfektionen in Europa verantwortlich. Der Wirt des PUUV, die Rötelmaus (*M. glareolus*), ist in fast ganz Europa heimisch (Markotic et al., 2002). Während in Nord- und Mitteleuropa fast ausschließlich der Serotyp PUUV endemisch ist, kommen in Ost- und Südeuropa auch die Serotypen HTNV, DOBV, SEOV und das Tulavirus vor (Papa et al., 1998; Sibold et al., 1999).

Tabelle 2: Übersicht über die Taxonomie der Familie Bunyaviridae mit ausgewählten humanpathogenen Erregern (modifiziert nach Mertens, 2006)

Genus*	Vertreter	Reservoir/Vektor	Vorkommen (Deutschland)	Erkrankung beim Menschen
Orthobunyavirus	La-Crosse-Virus	verschiedene Säugetierarten/Moskitos	Nordamerika (-)	Enzephalitis
Hantavirus	Sin Nombre virus (SNV)	Hirschmaus	Nordamerika (-)	HCPS
	Andesvirus (ANDV)	Reisratte	Südamerika (-)	HCPS
	Puumalavirus (PUUV)	Rötelmaus	Europa (+)	HFRS (NE)
	Tulavirus (TULV)	Feldmaus	Europa (+)	HFRS ?***
	Prospect Hill-Virus (PHV)	Wiesenwühlmaus	Nordamerika (-)	nicht humanpathogen
	Hantaanvirus (HTNV)	Brandmaus	Asien (-)	HFRS
	Seoulvirus (SEOV)	Haus- und Wanderratte	Asien, Amerika, Europa (?)	HFRS (?**)
	Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV)	Brandmaus (DOBV-Aa)	Europa (+)	HFRS
			Gelbhalsmaus (DOBV-Af)	Europa
	Thailandvirus (THAIV)	Bandikutratte	Asien (-)	HFRS (?***)
Thottapalayam-virus (TPMV)	Moschusspitzmaus	Asien (-)	(?***)	
Phlebovirus	Rifttalfiebertvirus (RVFV)	Wiederkäuer, Nagetiere	Afrika, Naher Osten (-)	Rifttalfieber
Nairovirus	Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV)	Nagetiere, Schafe, Ziegen /Zecken	Afrika, Südosteuropa (-)	Krim-Kongo-Häorrhagisches Fieber

HCPS: Hantavirales Cardiopulmonales Syndrom.

HFRS: Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom.

NE: Nephropathia epidemica, eine milde Form des HFRS.

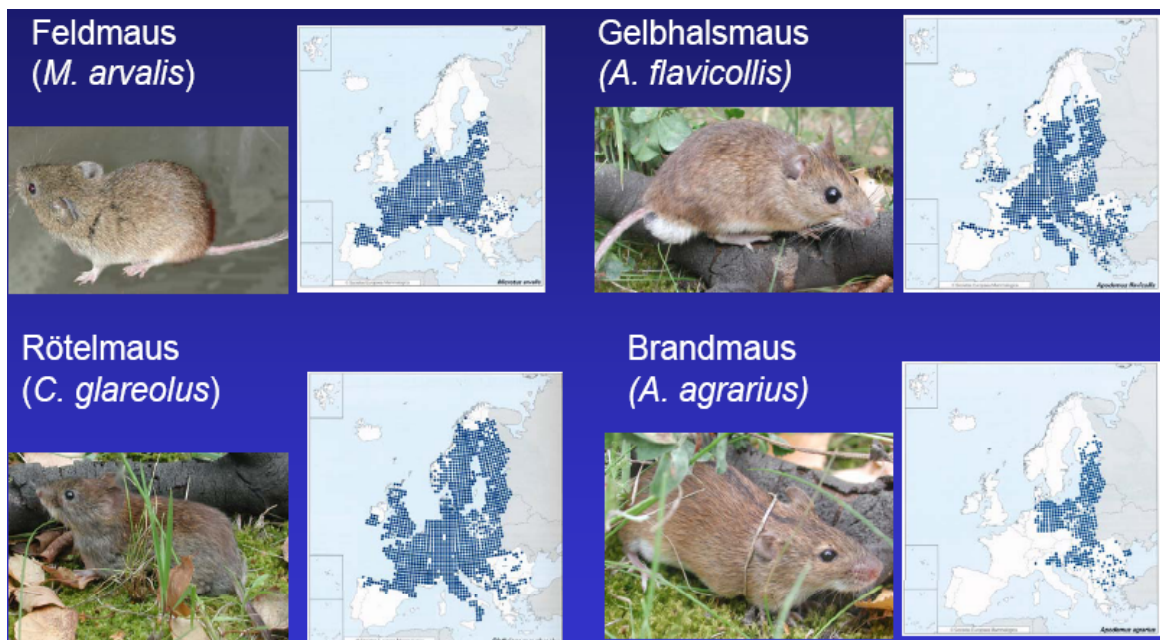
* **Das Genus Tospovirus wurde in der Übersicht nicht berücksichtigt, da es ausschließlich pflanzenpathogene Viren beinhaltet.**

** **Es gibt einzelne Hinweise zum Vorkommen des Seoulvirus (SEOV) bei Wanderratten in Europa, ohne dass jedoch bisher humane Infektionen mit diesem Virus in Deutschland beobachtet wurden (Ulrich et al., 2004; Heyman et al., 2004).**

*** **Zur Humanpathogenität von TULV, THAIV und TPMV ist bisher nur sehr wenig bekannt.**

Das Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV), das ein schweres HFRS auslösen kann, ist in ost- und südeuropäischen Ländern weit verbreitet (Avsic-Zupanc et al., 1992; Antoniadis et al., 1996; Lundkvist et al., 1997). DOBV-Stämme kommen in mindestens zwei Nagerspezies, der Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) und der Brandmaus (*A. agrarius*), vor. In Übereinstimmung mit diesen natürlichen Wirten bilden die Virusstämme zwei genetische Linien: DOBV-Af und DOBV-Aa (Klempa, 2005). Zu einer ebenfalls ähnlichen Abstammungslinie gehört das Saarema-Virus (Nemirov et al., 1999).

Abbildung 3: Verbreitung der verschiedenen Nagetierarten in Europa

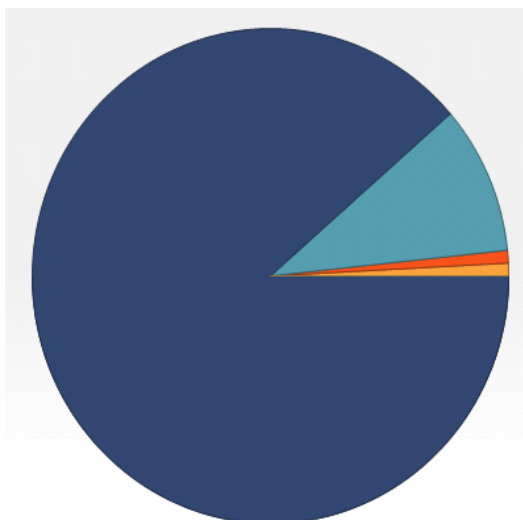


Alle vier dargestellten Mäusearten kommen in Europa sehr weit verbreitet vor, nur die Brandmaus (*A. agrarius*) ist vorzugsweise in Mittel- und Osteuropa zu finden. (Übernommen aus Ulrich, 2007)

1.7 Epidemiologie in Deutschland

In Deutschland zirkulieren drei verschiedene Hantaviren, weshalb Deutschland auch als „melting pot“ der verschiedenen Arten bezeichnet wird und ein hohes Potential für die Evolution der Hantaviren bietet. Diese drei Typen sind das Puumalavirus (PUUV), das Dobravavirus (DOBV) und das Tulavirus (TULV). Den Großteil der Infektionen in ganz Deutschland löst das von Rötelmäusen übertragene Puumala-Virus aus. Infektionen mit DOBV sind eher auf den Norden und Osten des Landes konzentriert (Meisel et al., 1998; Mentel et al., 1999). Im Jahr 2005 erkrankte ein Patient in Norddeutschland an HFRS, das den Sequenzanalysen zufolge durch einen Brandmaus-assoziierter DOBV-Stamm verursacht wurde (Klempa et al., 2004). Infektionen mit DOBV-Aa in Deutschland zeichnen sich durch einen milden Krankheitsverlauf aus, der der NE ähnlich ist (Meisel et al., 1998; Schütt et al., 2001). Von einer Infektion durch Tulaviren wurde erst ein einziges Mal aus dem Raum Cottbus berichtet (RKI, 2008). Über die Pathogenität dieser Spezies ist erst wenig bekannt (Kimmig et al., 2001; Klempa et al., 2003; Ulrich et al., 2004). Hinweise auf importierte Infektionen mit den hochvirulenten Neuwelt-Hantaviren gab es bisher keine. Dass dies jedoch eine Gefahr darstellt zeigt ein Fall im Oktober 2006, als ein importiertes DOBV-Af-Virus bei einem 65-jährigen Mann ein schweres HFRS auslöste (Schmidt-Chanasit et al., 2008). Potentielle Wirte für Hantaviren in Deutschland sind die Rötelmaus (*M. glareolus*), die Feldmaus (*Microtus arvalis*) und die Gelbhalsmaus (*A. flavicollis*). Doch auch Ratten und Spitzmäuse sind mögliche Überträger (Pilaski et al., 1991; Song et al., 2007).

Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der verschiedenen Hantavirus-Spezies in Deutschland.



Hantaviruspezies	Prozent
PUUV (dunkelblaues Feld)	88,3%
DOBV (orange und gelb)	2,1%
Undifferenziert (hellblaues Feld)	9,6%

(Quelle: www.3.rki.de/survstat. (Stand vom 01.06.08)
Die 9,6% „Hantavirus undifferenziert“ sind dadurch zu erklären, dass es eine starke Kreuzreaktivität zwischen den einzelnen Spezies gibt, sodass eine sichere Typisierung nicht immer gelingt.

Tabelle 3: Gesamtzahl der an das Robert Koch-Institut gemeldeten Hantavirus-Infektionen seit Einführung der Meldepflicht im Jahr 2001.

Bundesland	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Baden-Württemberg	59	164	65	120	110	22	1088
Bayern	29	17	18	61	41	12	294
Berlin	0	1	0	1	2	0	1
Brandenburg	0	0	1	0	3	0	4
Bremen	1	0	0	1	0	0	0
Hamburg	1	0	0	0	1	0	3
Hessen	21	8	13	5	34	4	27
Mecklenburg- Vorp.	4	8	4	4	4	1	11
Niedersachsen	11	5	3	11	75	6	93
Nordrhein-Westfalen	51	19	30	29	143	18	124
Rheinland-Pfalz	2	2	3	3	10	2	11
Saarland	1	0	0	0	0	0	2
Sachsen	0	1	0	2	2	1	5
Sachsen-Anhalt	2	1	3	2	2	0	3
Schleswig-Holstein	0	1	1	2	7	5	10
Thüringen	3	1	3	1	14	0	8
Gesamt	185	228	144	242	448	72	1684

Auffällig sind die Spitzenwerte im Jahr 2007 in den Bundesländern Bayern, Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen.

Quelle: www.3.rki.de/SurvStat. Stand vom 16.5.2008. Ausgelassen sind die Werte von 2008

In Deutschland besteht seit dem 01.01.2001 nach Infektionsschutzgesetz (IfSG) eine Meldepflicht für Hantavirusinfektionen. Seit der Einführung dieser Meldepflicht wurden bereits 3100 Fälle an das Robert Koch-Institut (RKI) gemeldet. Die wirkliche Zahl könnte noch bedeutend höher liegen, da eine große Dunkelziffer an klinisch inapparenten und nicht diagnostizierten Infektionen vermutet wird. 72 % der erkrankten Personen waren Männer, von denen wiederum über die Hälfte im Alter zwischen 30 und 49 Jahren waren. Die Inzidenz bei Männern (3,0 Erkr./100.000 Einw.) ist somit fast

dreimal so hoch wie bei Frauen (1,1 Erkr./100.000 Einw.). Bei unter 10-jährigen (9 Fälle) kommen Erkrankungen vergleichsweise selten vor. Bei Untersuchungen im Jahre 1995 wurde eine durchschnittliche Seroprävalenz der Normalbevölkerung in Deutschland von 1-2 % ermittelt (Zöller et al., 1995), wobei diese in den Endemiegebieten deutlich höher sein dürfte.

In Deutschland treten insbesondere in Teilen von Bayern und Baden-Württemberg hohe Inzidenzen auf (Pilaski et al., 1991; Schubert et al., 1991; Kimmig et al., 2001). In den letzten Jahren stieg auch in Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen die Zahl der Infektionen stark an (siehe Tabelle 3). Die Inzidenzen fluktuierten seit 2001 stets wellenförmig, so gab es zum Beispiel 2002 und 2004 Ausbrüche in Baden-Württemberg. Die meisten Infektionen wurden bisher in ländlichen Gebieten diagnostiziert, aber die Zahlen in urbanen Räumen steigen ebenfalls (Koch, 2006; Essbauer et al., 2007). Zum Beispiel in der Stadt Köln hatten sich im Jahr 2005 viele Jogger und Spaziergänger im Stadtpark infiziert (Essbauer et al., 2007).

1.8 Zielsetzung

Im Jahr 2007 hat die Zahl der registrierten Hantavirusinfektionen in Deutschland deutlich zugenommen. In diesem Jahr wurden 1688 Fälle an das Robert Koch-Institut übermittelt. Dieser Wert lag somit fast achtmal höher als der Durchschnittswert der Vorjahre und zeigt die zunehmende Gefährdung durch Hantaviren in Deutschland.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Vorkommen von Hantaviren in den Reservoirwirten in Unterfranken und der Eifel zu untersuchen und die auslösende Virusspezies zu identifizieren. Nach einem serologischen Screening der Kleinsäuger sollen die positiven Proben durch Bestätigungstests verifiziert und anschließend die virale RNA sequenziert und phylogenetisch analysiert werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Durchseuchung der Reservoirwirte und der Anzahl von humanen Hantavirusinfektionen gibt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid	(Roth, Karlsruhe)
Agarose	(Sigma, Deisenhofen)
Albumin aus Rinderserum (BSA)	(Serva, Heidelberg)
Ammoniumpersulfat	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumsulfat	(Merck, Darmstadt)
Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	(J.T. Baker, Deventer,Holland)
Borsäure	(Hema, Nürnberg)
Coomassie Brilliant Blau G-250	(Serva, Heidelberg)
Glyzerin	(Roth, Karlsruhe)
Glyzin	(Roth, Karlsruhe)
D-(+)-Galaktose	(Roth, Karlsruhe)
D-(+)-Glukose	(Roth, Karlsruhe)
DNA-Leiter (DNA Mass Ladder)	(Cerela, Alameda,Kalifornien, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Serva, Heidelberg)
Ethanol 70%	(AppliChem, Darmstadt)
Ethidiumbromid	(Sigma, Deisenhofen)
Fischgelatine	(Weishardt, Köln)
Formaldehyd	(Roth, Karlsruhe)
Guanidinhydrochlorid (GuHCl)	(Fluka, Neu-Ulm)
Harnstoff	(Roth, Karlsruhe)
Hefe-Extraktionspulver	(ICN Biomed., Eschwege)
Isopropanol	(Euroseptica, Freiburg)
Kaliumchlorid (KCl)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhydrogencarbonat (KH ₂ PO ₄)	(Roth, Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	(Roth, Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	(Roth, Karlsruhe)

Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	(Roth, Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(Serva, Heidelberg)
Natriumhydrogencarbonat	(Roth, Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	(Roth, Karlsruhe)
Nickel-Chelat-Agarose	(Qiagen, Hilden)
Methanol	(Roth, Karlsruhe)
Magermilchpulver	(Mikrogen, Neuried)
Pepton aus Kasein	(Roth, Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	(Fluka, Neu-Ulm)
Phosphorsäure	(Roth, Karlsruhe)
Rnase Inhibitor	(Applied Biosystems, FosterCity,Kalifornien,USA)
Schwefelsäure(H ₂ SO ₄)	(DadeBehring, Marburg)
Tetramethylbenzidin (TMB)	(DadeBehring, Marburg)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	(Roth, Karlsruhe)
Tris	(Invitrogen, Carlsbad)
Tween 20	(Sigma, Deisenhofen)
Waschpufferkonzentrat	(Mikrogen, Neuried)

2.1.2 Puffer und Lösungen

2.1.2.1 Hefeanzucht

Yeast Extract Peptone Dextrose-GalactoseMedium (YEPD)

10g Hefe-Extraktionspulver
 20 g Pepton aus Kasein
 500 ml Destilliertes Wasser
 20 g D-(+)-Glukose
 500 ml Destilliertes Wasser
 250 ml YEPD-Medium + 125 µl
 oder + 75 µl Formaldehyd

Yeast Extract Peptone Medium (YEPG)

10g HefeExtraktionspulver
 20g Pepton aus Kasein
 500 ml Destilliertes Wasser
 60 g (+)-Galaktose
 500 ml Destilliertes Wasser

2.1.2.2 Proteinaufreinigung

10 x PBS

79,48 g	NaCl
1,94 g	KCl
14,42 g	NaH ₂ PO ₄
2,04 g	KH ₂ PO ₄
1 Liter	destilliertes Wasser

Puffer A (Lyse Puffer)

1,3799 g	NaH ₂ PO ₄ (100 mM)
0,12114 g	Tris (10 mM)
51,318 g	GuHCl (6M)
100 ml	destilliertes Wasser
Puffer A:	pH 8,0

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) Stocklösung

0,1742g	PMSF (100mM)
10 ml	Isopropanol

Puffer B-E

5,5196 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
0,48456 g	Tris (10 mM)
192,192 g	Harnstoff (8 M)
400 ml	destilliertes Wasser

Zellaufschluss Puffer

0,05846 g	EDTA (2mM)
100 ml	1x PBS
30 µl/3 ml	PMSF (1mM)

Puffer B	pH 8,0
Puffer C	pH 6,3
Puffer D	pH 5,6
Puffer E	pH 4,5

Extraktions Puffer

1 ml	Tween 20
100 ml	1 x PBS
100 µl /10ml	PMSF (1 mM)

2.1.2.3 Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot

Trenngel

3,36 ml	H ₂ O
1,875 ml	Tris (1,5M)pH 8,8
2,44 ml	Acrylamid (40%)
+ 75µl	SDS (10%)
+ 50 µl	APS (10%)
5 µl	TEMED

Sammelgel

3,28 ml	H ₂ O
1,25 ml	Tris (0,5M) pH 6,8
0,65 ml	Acrylamid (40 %)
+ 50 µl	SDS (10%)
+ 50 µl	APS (10%)
+5 µl	TEMED

Blotting-Puffer

3,03 g/l Tris
200 ml Methanol
14,4 g/l Glycin
2 g/l SDS
1l H₂O

Lösung B

PBS mit 0,1% Tween pH=7,2

Lösung C

PBS pH = 7,2

Lösung A

50 µl Tween 20
2 ml Fischgelatine
100 ml PBS

Waschpuffer

0,5 g Magermilchpulver
10 ml Waschpufferkonzentrat
90 ml dd H₂O

Colloidale Coomassie-Färbelösung

23,5 ml 85 % *o*-Phosphorsäure
100 g Ammoniumsulfat
200 ml Methanol
10 ml Farbstoffstammlösung
1290 ml H₂ bidest.

Farbstoffstammlösung

10 g Coomassie Brilliant Blue
90 ml 50%iges Methanol
in 100 ml dd H₂O

2.1.2.4 Enzymimmunoassay (EIA)

Puffer 1:

0,05M Carbonatpuffer, pH 9,8
(0,424 g Na₂CO₃ + 0,504 g NaHCO₃)

Puffer 2:

1% BSA in PBS-Tween 20, 0,05%

Puffer 3:

0,5% BSA in PBS-Tween 20, 0,05%

Waschpuffer:

PBS-Tween 20 0,1% pH 7,2-

2.1.2.5 Polymerase-Kettenreaktion/Sequenzierung

10 x TBE:

53,9 g Tris
27,5 g Borsäure
3,72 g EDTA
500 ml Destilliertes Wasser

Agarosegel 2%:

65 ml 0,5 x TBE
1,3 g Agarose

2.1.3 Spezielle Geräte

Automatisierter Sequenzer
(Modell ABI 3100 AVAND)
Absauger VACUSAFEcomfort
ELISA Photometer MR7000
Bilddokumentationssystem
Elektrophoresekammer mit Zubehör
Mikrowelle
Rotor Sw 28

Rotor A-4-44
Papierschreiber
Schüttler Certomat H
Spannungsgerät
Sterilbank Hera Safe Typ KS15
Tischschüttler Typ-520
Tischzentrifuge 5417R
Thermocycler
Thermomixer
Transilluminator Biometra TI 2
Ultrazentrifuge Optima L-90K

Vortexer Reax top
Zentrifuge 5804R

Hersteller

(Applied Biosystems,
Foster City, Kalifornien, USA)
(IBS Integra, Chur, Schweiz)
(DynaTech, Rückersdorf)
(Herolab, Wiesloch)
(Biozym, Oldendorf)
(Miele, Gütersloh)
(Beckmann Coulter GmbH,
Unterschleißheim)
(Eppendorf, Hamburg)
(Epson, Meerbusch)
(Braun, Sempach)
(BioRad, München)
(Thermo, Langensfeld)
(M.Zipperer, Staufen)
(Eppendorf, Hamburg)
(Perkin Elmer, Waltham)
(Eppendorf, Hamburg)
(Biometra, Göttingen)
(Beckmann Coulter GmbH,
Unterschleißheim)
(Heidolph, Kelheim)
(Eppendorf, Hamburg)

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße (1,5 und 2ml)
Filterspitzen
Glasperlen
Mikroreaktionsgefäße
Mikrotiterplatten (96well), Polysorp
Petrischalen

Hersteller

(Eppendorf, Hamburg)
(TipOneStarLabGmbH,Ahrensburg)
(Sigma, Deisenhofen)
(Eppendorf, Hamburg)
(Nunc, Kampstrup, Dänemark)
(Nunc, Kampstrup, Dänemark)

Polypropylen Säule (5ml)	(Qiagen, Hilden)
PVDF-Folie, Immobilon-P	(Millipore, Schwlbach)
Trans-Blot SD	(BioRad, München)
Zellkulturröhrchen (50 ml)	(Falcon, Göttingen)

2.1.5 Kits

Hersteller

Dye Ex 96 Kit	(Qiagen, Hilden)
One Step RT – PCR	(Qiagen, Hilden)
RTP DNA/RNA Virus Mini Kit	(Invitek, Berlin)
Taq PCR Master Mix Kit	(Qiagen, Hilden)

2.1.6 Biologische Materialien

2.1.6.1 Hefestämme

Für die Expression der N-Proteine von PUUVvra und DOBVslo wurden rekombinante Hefezellen der Stämme gcn2 und fh4c verwendet.

2.1.6.2 Plasmide

Genkarte des Hefeexpressionsplasmids pFX7 (Sasnauskas et al., 1999)

Das Derivat dieses Vektors (pFX7-6His) enthält zusätzlich im XbaI-Ort die Sequenz für Translationsinitiation (ATG) und 6 Histidin-Kodons (Razanskiene et al., 2004).

Gal10/ Pyk1: Durch Galaktose induzierbarer Hybridpromotor für Hefeexpression

PGK1: Transkriptionsterminator

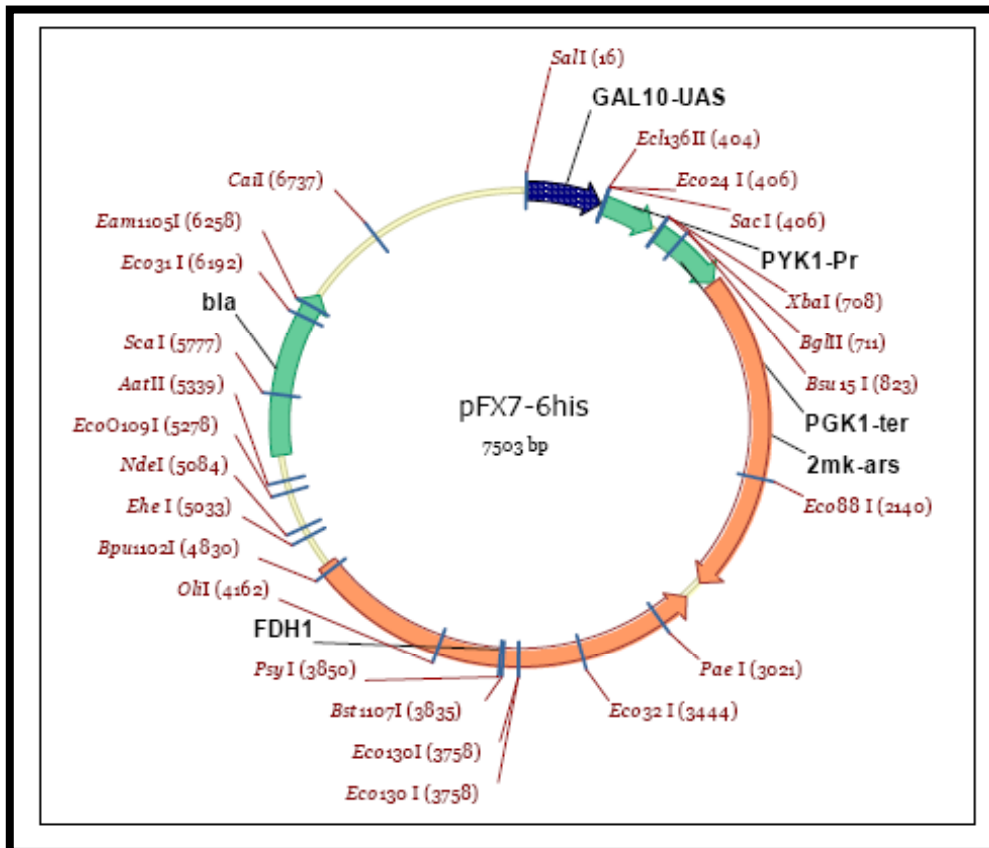
2m: 2 μ - Replikationsursprung für Hefe

FDH1: Formaldehydesistenzgen von *Candida albicans*

PUC19: Plasmid-backbone mit colE1-Replikationsursprung und Ampicillinresistenzgen

XbaI: Unikaler Restriktionsort für die Insertion von Fremdsequenzen

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Plasmids pFX7-His6 (modifiziert aus Sandmann et al., 2005)



Zur Herstellung der rekombinanten N-Proteine wurde die entsprechende N-Protein kodierende DNA-Sequenz am XbaI-Spaltort in das Plasmid kloniert. Die mittels pFX7-6His exprimierten Proteine enthalten am N-terminalen Ende einen 6 Histidin-Rest, was die Reinigung per Nickelchelate-Affinitätschromatographie möglich macht.

Abbildung 6: Schematische Darstellung eines in Hefe synthetisierten Hantavirus-Nukleokapsid-Proteins



M = Methionin, **H** = Histidin, Serin-Arginin-Linker (**SR**)-kodierende Sequenz beinhaltet den XbaI-Klonierungsort für die N-Protein-kodierende Sequenz, durch die sechs Histidin-Reste können die Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Mertens et. al.,2007). (Übernommen aus Schlegel, 2008).

2.1.7 Antikörper

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Konjugat

(BioRad, München)

2.1.8 PRIMER

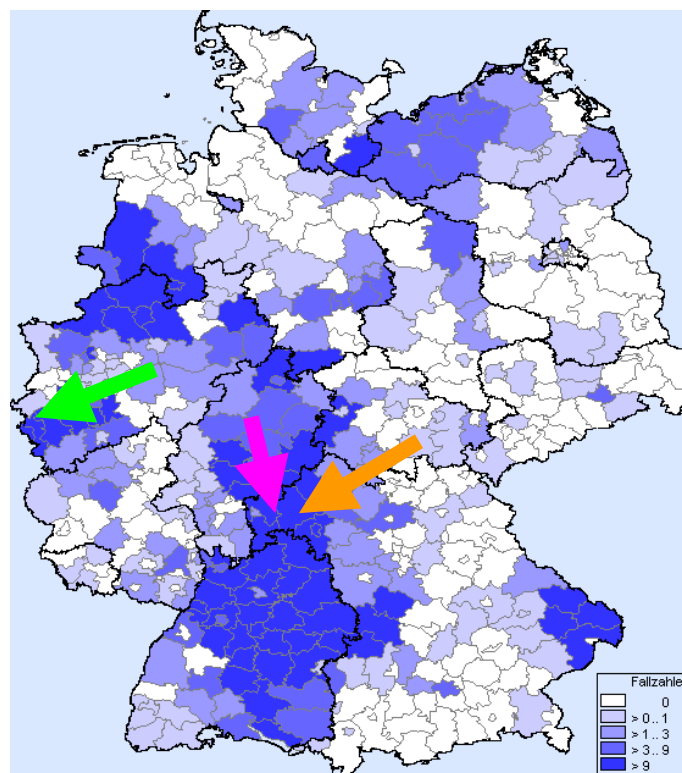
PCR	Name	Schmelz- temperatur (T _m)	Sequenz	Referenz
RT-PCR S-Segment	PU1102R	45,9 °C	5'-GCC-ATD-ATD-GTR-TTY-CTC-AT-3'	Essbauer et al., 2006
RT-PCR S-Segment	PU342F	47,9 °C	5'-TAT-GGT-AAT-GTC-CTT-GAT-GT-3'	Essbauer et al., 2006
Nested PCR S-Segment	PU390F	49,6 °C	5'-GGN-CAR-ACA-GCR-GAT-TGG-T-3'	Essbauer et al., 2006
Nested PCR S-Segment	PU721R	47,2 °C	5'-ACH-CCC-ATN-ACW-GGR-CTY-AT-3'	Essbauer et al., 2006
M-Segment	M1	59,1 °C	5'-ACC-TGA-TTG-TCC-AGG-GGT-AGG-3'	Pilaski et al., 1994
M-Segment	M2	55,1 °C	5'-GGG-TTC-TGT-AAC-ATT-GAA-TGA-TTG-3'	Pilaski et al., 1994

2.2 Methoden

2.2.1 Mäusefang und Sektionen

Die Stadt-/bzw. Landkreise Aachen in Nordrhein-Westfalen sowie Aschaffenburg und Main-Spessart in Bayern wurden als Fangorte ausgewählt, da diese Regionen schon länger als Endemiegebiete bekannt sind und die Genomsequenzen der in diesen Gebieten zirkulierenden Spezies noch nicht identifiziert wurden. Zusätzlich ist im Jahr 2007 die Zahl der Neuerkrankungen in den Landkreisen Main-Spessart und Aschaffenburg im Vergleich zu den Vorjahren massiv angestiegen (Abbildung 8). Während im Durchschnitt in den Jahren 2001-2006 nur drei Personen pro Jahr erkrankt waren, waren es im vergangenen Jahr 37 Personen. Im Stadt-/Landkreis Aachen war die Zahl der Inzidenzen im Jahr 2005 mit 25 Fällen besonders hoch. Davon hatten sich 84% der Fälle in stadtnahen Gebieten infiziert.

Abbildung 7: Deutschlandkarte mit den kumulativen Inzidenzen von klinisch apparenten Hantavirus – Infektionen in Deutschland vom 1.1.2001 – 16.05.2008

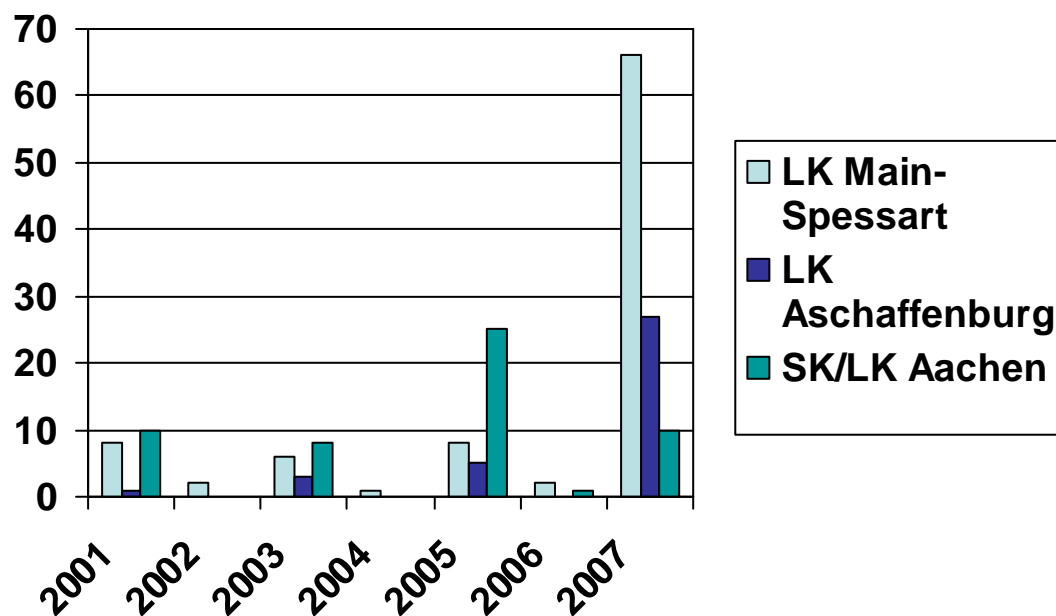


(Karte modifiziert aus www.3.rki.de/SurvStat, Datenstand der Abfrage: 16.05.2008)

Mit den Pfeilen gekennzeichnet sind die Landkreise Main-Spessart (orange), Aschaffenburg (rosa) und Aachen (grün). Inzidenz = Anzahl der Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner

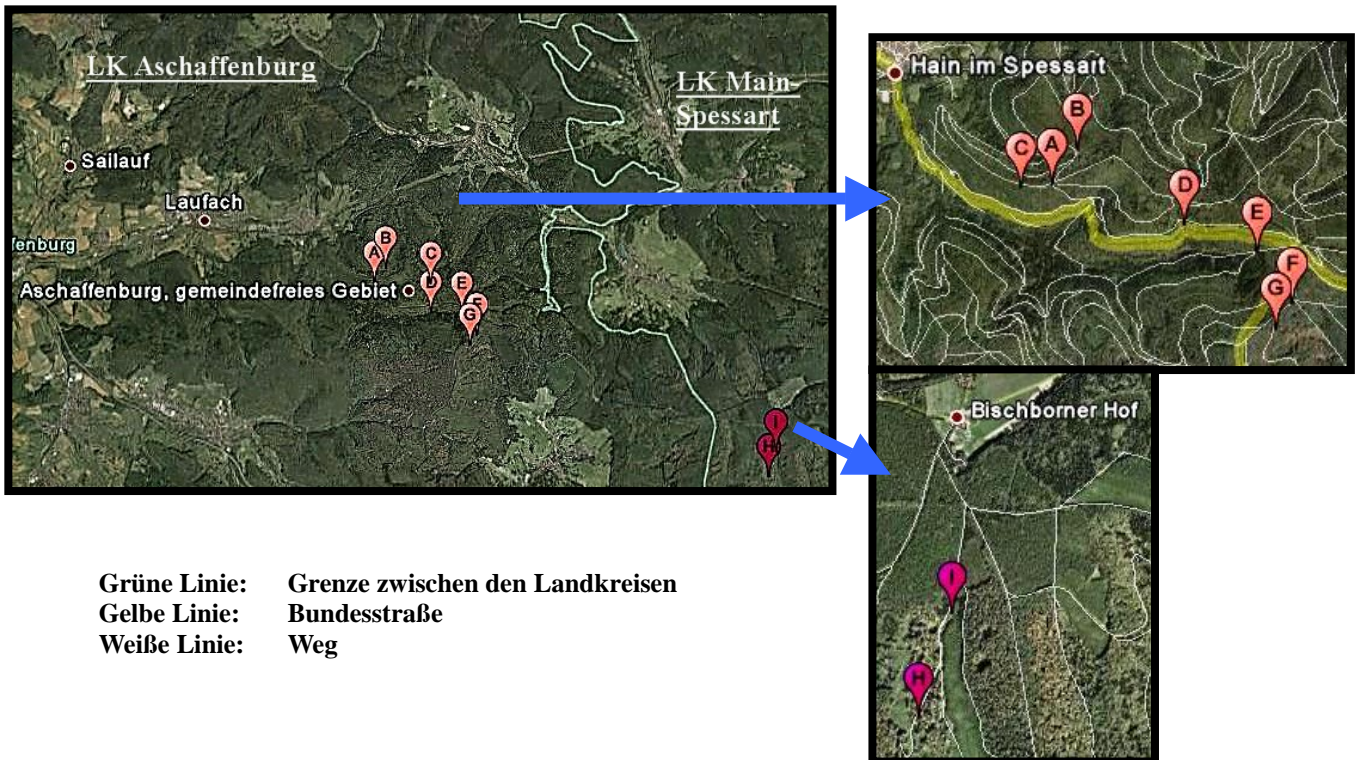
Die Patienten in den betroffenen Gebieten waren ausschließlich an „Nephropathia epidemica“ erkrankt. Diese Erkrankung wird von Puumala-Viren ausgelöst und deren natürlicher Wirt ist die Rötelmaus. Somit wurde die Auswahl der Fangorte von dem Ziel bestimmt, möglichst viele Rötelmäuse in den Endemiegebieten zu fangen und damit eine breite Datenbasis zu erlangen. Da sich diese Spezies bekanntlich gerne in Mischwaldbeständen und am Waldrand, sowie in waldnahen Gärten und Scheunen aufhält, versuchten wir, uns bei der Auswahl der Fangorte daran zu orientieren.

Abbildung 8: Zahl der erkrankten Personen in den Jahren 2001 – 2007 in den verschiedenen Landkreisen.



(Die Werte wurden entnommen aus www.3.rki.de/survstat. Stand vom 16.05.2008.).

Abbildung 9: Übersicht über die Fangorte in den Landkreisen Aschaffenburg sowie Main-Spessart



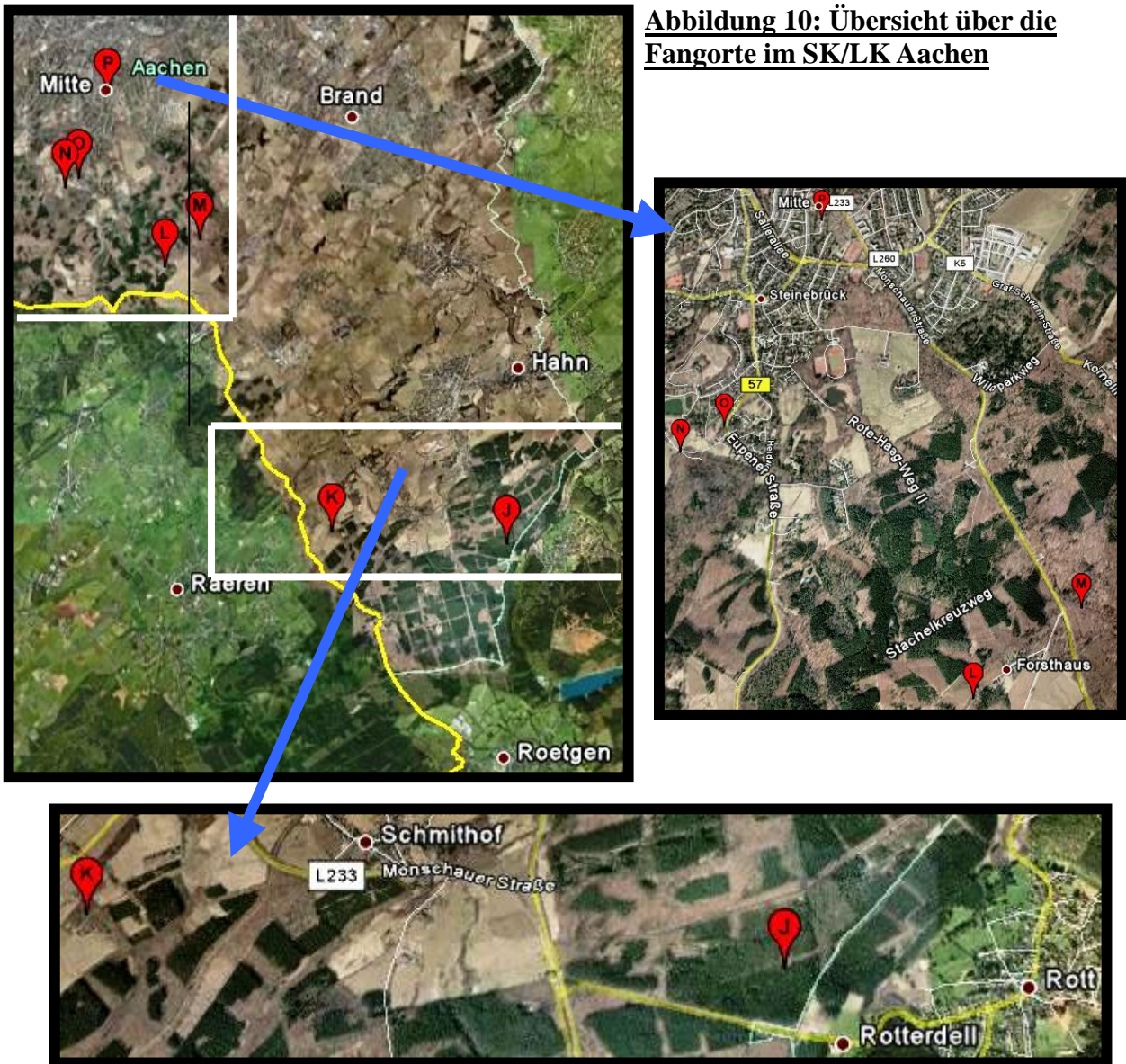
LK Aschaffenburg

- A: Laufach, Metzberg:
N50°00'03.2"E069°20'44,8"
- B: Laufach, Metzberg:
N50°00'12.8"E009°20'56.8"
- C: Laufach, Metzberg:
N50°00'02.2"E009°20'30.6"
- D: Laufach, Miesgrund4:
N49°59.51"E009°21'44.0
- E: Laufach, Miesgrund5:
N49°59'42.9"E009°22'16.6"
- F: Laufach, Miesberg:
N49°59'27.8"E009°22'32.2"
- G: Laufach, Tiergartengrund:
N49°57'20.7"E009°22'25.0"

LK Main-Spessart

- H: Rechtenbach, Schwarzer Rück:
N49°57'52.5"E009°27'34.9"
- I: Rechtenbach, Gaulberg:
N49°58'09.2"E009°27'42.6"5

Abbildung 10: Übersicht über die Fangorte im SK/LK Aachen



SK/LK Aachen:

J: Rott, Deutsch-Belgischer-Naturpark Hohes Venn-Eifel:

N 50°40'58.9"E006°11'41.9"

K: Sief, Forsthaus Magelspfad:

N 50°41'05.9"E 006°09'02.0"

L: Grüne Eiche, Aachener Stadtwald:

N 50°43'39.3"E 006°06'29.2"

M: Hitfeld, Aachener Stadtwald:

N 50°43'55.5"E 006°07'00.7"

N: Düsberg Kopf, Aachener Stadtwald:

N 50°44'26.1"E 006°04'56.3"

O: Stadtgebiet Aachen, Steinebrück 2:

N 50°45'19.8"E 006°05'33.8"

P: Stadtgebiet Aachen, Burtscheid:

N 50°45'19.8"E 006°05'33.8"

Q: Stadtgebiet Aachen, Steinebrück:

N 50°45'01'0"E°006°05'26.7"

Die Mäuse wurden mit Schlagfallen gefangen, die im Abstand von mindestens einem Meter aufgestellt wurden. Die toten Tiere wurden separat in verschließbare Plastiktüten bei -20° eingefroren und entsprechend dem Fangort und dem Fangdatum beschriftet.

Die Sektionen wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Die Mäuse wurden an Vorder- und Hinterextremitäten auf dem Rücken liegend auf einem Styroporbrett, das zuvor mit Alufolie abgedeckt worden war, mit Nadeln fixiert. Mit einer sterilen Pinzette wurde die Bauchhaut unmittelbar über der Geschlechtsöffnung ein wenig angehoben und dann mit einer ebenfalls sterilen Schere ein Schnitt durch Haut und Bauchdecke durchgeführt. Die Schnitte wurden nach kranial weitergeführt und der Brustkorb mittig eröffnet. Zunächst wurden Herz und Lungen entnommen, dann das Transsudat im Brustkorb mit einer 1 ml- Pipette abgesaugt und dann folgten Milz, die Nieren, die Leber sowie das Gehirn. Die Kadaver wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren inaktiviert. Sowohl die Organproben als auch das Transsudat wurde bei -20° gelagert.

2.2.2 Proteinaufreinigung

2.2.2.1 Transformation und Anzucht der Hefe-Klone

Die Hefezellen wurden freundlicherweise von PD Dr. Rainer Ulrich und Marc Mertens aus dem Friedrich Löffler-Institut bereits fertig transformiert zur Verfügung gestellt. Die Hefe-Kolonien von den YEPD-Platten wurden in 250 ml YEPD-Medium überführt und 24 Stunden bei 28°C auf einem Schüttler bei höchster Frequenz inkubiert. Danach wurden unter sterilen Bedingungen 250 ml YEPG-Medium hinzu gegeben und noch einmal 20 Stunden bei 28°C inkubiert. Das Galaktose-Medium induzierte eine höhere Proteinbildung, da sich ein Galaktosepromotor im Plasmid befand. Anschließend wurde die Flüssigkeit auf 50er Falcon-Röhrchen aufgeteilt und zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang noch einmal wiederholt, bevor die entstandenen Pellets über Nacht bei -70°C eingefroren wurden.

2.2.2.2 Lyse der Hefe-Zellen

Von nun an wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Die Pellets wurden in 2 ml Zellaufschluss-Puffer resuspendiert und mit Glasperlen versetzt. Anschließend wurde jedes Falcon-Röhrchen sieben Mal eine Minute gevortext um die Zellen aufzubrechen und der jeweilige Überstand in weitere 50er Falcon-Röhrchen überführt. Um Zellrückstände zu sedimentieren wurde diese Flüssigkeit zehn Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurde entnommen und 40 Minuten bei 10000 rpm in einer Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert um die nicht löslichen Proteine von den löslichen zu trennen. Erneut wurde der Überstand verworfen, die Pellets mit Extraktions-Puffer resuspendiert und über dreißig Minuten immer wieder gevortext. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, bevor die Pellets in Puffer A (Lyse-Puffer) resuspendiert wurden.

Die Nickel-Chelat-Agarose wurde vorbereitet, indem sie mit Puffer A gemischt, mehrmals zentrifugiert und mit dem gewonnen Hefe-Überstand eine Stunde vorsichtig geschüttelt wurde. Anschließend wurde die Suspension auf eine Polypropylen-Säule gegeben. Langsam wurden nacheinander 10 ml von Puffer A, Puffer B, Puffer C und Puffer D auf die Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Somit konnten Proteine, die sich nicht an die Nickel-Chelat-Agarose binden konnten, entfernt werden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Nachdem das Eluat mit Puffer E versehen war, wurde es über Nacht geschüttelt und der Durchlauf am nächsten Morgen in 15er-Falcons überführt.

Die Proteinquantifizierung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, M.M., 1976) bestimmt, in der mittels Extinktionskoeffizient die Proteinmenge ermittelt werden kann.

2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-elektrophorese (SDS-PAGE), Western Blot

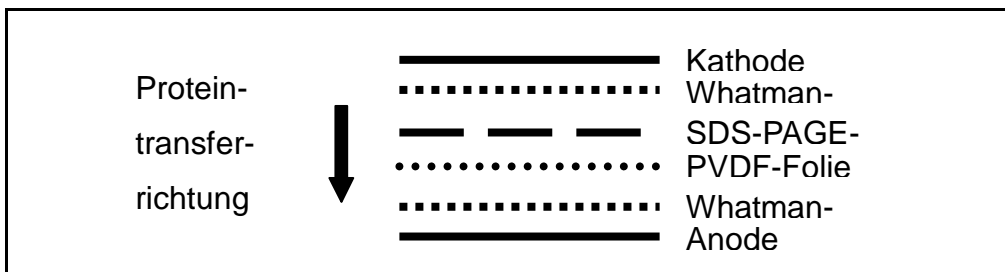
Der Proteinnachweis wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt. Vor dem eigentlichen Western Blot wurden die gewonnenen N-Proteine mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe in einzelne Proteinbanden aufgetrennt.

Die SDS- Polyacrylamidgele bestanden aus einem Sammelgel (5%) und einem Trenngel (12.5%). Diese Trenngelkonzentration ermöglichte eine optimale Auftrennung der

rekombinanten hantaviralen N-Proteine. Dann wurde die Antigenlösung angesetzt und für fünf min. bei 95 °C im Thermoblock gekocht und dann herunter zentrifugiert. Die Antigenlösung wurde in die Geltaschen aufgetragen, zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenmarker auf das Gel geladen. Danach wurde eine elektrische Spannung von zunächst 60 V für 20 min. und dann 200 V für 30 min. angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proteine bewirkte. Über Nacht wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung geschüttelt.

Beim Western Blot wurde mit dem Semidry-Verfahren ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Proteine konnten so aus dem Gel auf eine Membran wandern, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten blieb. Eine Folie wurde hierfür 15 sec. in Methanol, zwei min. in destilliertem Wasser und dann vier min. in Blotting Puffer geschwenkt. Die Whatman-Filter wurden ebenfalls eine min. in Blotting Puffer geschwenkt, bevor die Apparatur folgendermaßen angeordnet wurde:

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Aufbaus der Proteintransfer – Einheit (Semi – Dry Verfahren) (Übernommen aus Schlegel, 2007)



Der Antigentransfer fand 90 min. bei 20 V statt, danach wurde die Folie für eine Stunde in Lösung A geblockt und stand nun für die Immunreaktion zur Verfügung.

2.2.4 EIA, Immunoblot

Die Folie wurde mit der in Lösung A 1:200 verdünnten IgG-Serumprobe 90 min. inkubiert wobei sich die Antikörper an die Antigene auf dem Streifen binden konnten, wenn jene vorhanden waren. In einem Waschschrift mit Lösung B wurden nicht gebundene Antikörper abgewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper „antiMaus-IgG-HRP“, der mit Lösung A im Verhältnis 1:3000 gemischt worden war, auf die Folie gegeben und ebenfalls eine Stunde inkubiert. Der Sekundärantikörper konnte an die

gebundenen Primärantikörper binden. Nach erneuten Waschschrritten mit Lösung B sowie Lösung C und kurzer Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat erschien bei den positiven Proben an der entsprechenden Stelle, an der eine Antigen/Antikörper-Reaktion stattgefunden hatte, eine dunkle Bande. Die Farbreaktion wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser abgestoppt und die Folie konnte mit einem Photoimager ausgewertet werden. Zur Bestimmung hantavirusspezifischer Antikörper kam ein anti-Hanta-IgG-ELISA zum Einsatz, der nach folgendem Prinzip durchgeführt wurde: Die rekombinanten hefeexprimierten N-Proteine der Hantaviren wurden in Puffer 1 auf 2 µg/ml verdünnt und die Mikrotiterplatten mit 100 µl pro Vertiefung für eine Stunde bei 37 °C beschichtet. Hierbei wurde jeweils eine Reihe Puffer mit Antigen und darunter eine Reihe reiner Puffer 1 ohne Antigen gefüllt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Exemplarisches Auftragungsschema einer EIA – Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PK	NK
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

In den Spalten 1-10 wurden jeweils verschiedene Mäuseseren aufgetragen, die dann jeweils einmal mit Antigen (grau unterlegt und mit „+“ gekennzeichnet) und einmal ohne Antigen (-) getestet wurden. Auf einer Platte konnten nach diesem Schema 40 Mäuseseren durchgescreent werden.

PK = Positivkontrolle

NK = Negativkontrolle

Anschließend wurden die Platten trocken geklopft und für eine Stunde bei RT mit 200 µl/Vertiefung mit Puffer 2 inkubiert. Die Platten wurden daraufhin erneut trocken geklopft und die Vertiefungen mit 100 µl einer Mischung aus den Mäuseseren und Puffer 3 im Verhältnis 1:200 gefüllt. Diese Mischung wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Platten anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen. POD-konjugiertes antiMaus-IgG wurde in Puffer 3 verdünnt (1:3000) und nach Zugabe von 100 µl/Vertiefung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden erneut dreimal gewaschen und danach wurden 100 µl/Vertiefung Tetramethylbenzidin (TMB)-

Substrat zugegeben um eine Peroxidase-Reaktion hervorzurufen die nach zehn Minuten durch die Zugabe von 100 µl/Vertiefung Schwefelsäure-enthaltender Stopplösung beendet wurde. Anschließend wurde die Extinktion photospektrometrisch bei 450 nm (620 nm Referenz) gemessen und die Extinktionsdifferenz (Probe + Ag) - (Probe - Ag) berechnet. Der Mittelwert der Negativkontrollen sowie die Standardabweichung wurden berechnet. Aus dem Mittelwert der Negativkontrollen plus der fünfmaligen Standardabweichung wurde der „cut-off“ berechnet, der für PUUV 0,1714 betrug, für DOBV 0,139. Folglich wurden alle Proben mit einem Extinktionswert oberhalb des „cut-off“ als positiv und alle mit einem Extinktionswert unterhalb des „cut-off“ als negativ bezeichnet.

2.2.5 RNS – Isolierung aus Gewebeproben der Lunge

Die Isolierung der RNS aus Lungenproben der Rötelmäuse (*M. glaroleus*) wurde mit dem „RTP DNA/RNA Virus Mini Kit“ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden ca. 10 mg der Lungenproben mit 400 µl Lysepuffer gemischt. Die Proben wurden im Thermomixer bei 65 °C und dann bei 95 °C lysiert und anschließend zentrifugiert um ungelöstes von gelöstem Material zu trennen. Der Überstand wurde mit 400 µl „Binding Solution“ gemischt, auf einen Filter gegeben und wieder zentrifugiert, diesmal eine Minute bei 12.000 rpm. Nun wurde die RNA im Filter mit „Puffer R1“ und dann „Puffer R2“ gereinigt und schließlich mit „Elutions-Puffer“ ausgewaschen und die gewonnene RNA aufgefangen.

2.2.6 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Das grundlegende Prinzip der PCR ist die Vervielfältigung doppelsträngiger DNS mittels einer hitzestabilen DNS-Polymerase durch einen sich mehrfach wiederholenden, dreigeteilten Reaktionsablauf. Durch hohe Temperaturen werden die beiden DNS-Stränge voneinander getrennt (Initialisierungsphase). Im folgenden Hybridisierungsschritt binden spezifische Oligonukleotidprimer an die einsträngige DNS (Primerhybridisierung). Von diesen ausgehend kann die hitzestabile DNS-Polymerase im Elongationsschritt den kompletären Strang in 5'-3'-Richtung synthetisieren (Elongation). Das Besondere an der RT-PCR ist, dass zunächst die RNS in DNS umgeschrieben werden muss, da die hitzestabile DNS-Polymerase DNS-abhängig ist. Deshalb muss RNS stets zunächst in cDNS umgeschrieben werden, damit

diese daraufhin in der PCR amplifiziert werden kann.

Als grundlegende Komponenten benötigt die PCR stets die DNS/RNS (Template), zwei Primer, eine DNS-Polymerase sowie Desoxynukleosidtriphosphate, die Bausteine für den von der DNS-Polymerase synthetisierten Strang. Außerdem muss durch Pufferlösungen eine für die DNS-Polymerase geeignete chemische Umgebung sichergestellt werden. Für die in unserem Fall durchgeführte RT-PCR wird außerdem eine Reverse Transkriptase benötigt um die RNS in DNS umzuschreiben.

2.2.6.1 RT – PCR

Um die RT-PCR durchzuführen wurde das „OneStep RT-PCR Kit“ verwendet, in dem die Reverse Transkription sowie die PCR zu einem Schritt vereint werden. 30 µl pro zu testende Probe des „Master Mix“ wurden angemischt, der mit jeweils 20 µl des RNA Templates gemischt wurde. Damit die Reverse Transkriptase ansetzen konnte wurden die Primer „Pu 342 F“ sowie „Pu 1102 R“ verwendet. Für die Umschreibung von RNA in cDNA war eine Reverse Transkriptase im Mix enthalten, weiterhin ein Inhibitor zur Unterdrückung von RNasen. Die RT-PCR erfolgte nach diesem Schema.

- | | | | |
|-------|---------|-------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | 30 min. | 45 °C | |
| 2. | 15 min. | 95 °C | |
| <hr/> | | | |
| 3. | 30 sec. | 94 °C | ↑ 45 x
<i>Denaturierung</i>
<i>Primerhybridisierung</i>
<i>Elongation</i> |
| 4. | 30 sec. | 46 °C | |
| 5. | 1 min. | 72 °C | |
| <hr/> | | | |
| 6. | 10 min | 72 °C | |
| 7. | ∞ | 4 °C | |

Master Mix in der „One-step RT-PCR“ für RT-PCR des S- sowie des M-Segmentes

(alle Chemikalien gehören zum „RT-PCR-OneStep“ Kit)

- 4 µl RNase – freies H₂O
- 10 µl Puffer (Konzentration 5x)
- 10 µl Q – Solution (Konzentration 5x)
- 0,5 µl Primer „Pu342 F“ bzw. „M1“ (50 µM)
- 0,5 µl Primer „Pu1102F“ bzw. „M2“ (50 µM)
- 2 µl Enzym – Mix (1 mM)
- 2 µl d NTP's (10mM)
- 1 µl Rnase Inhibitor 20 Units/µl

2.2.6.2 Nested PCR vom S - Segment

Zur Erhöhung der Spezifität und der Sensitivität wurden zwei PCR-Reaktionen hintereinander geschaltet. Mit der „Nested“ PCR können auch geringe Mengen an Template nachgewiesen werden. Das Amplifikat der ersten PCR diente dabei als Zielsequenz für die zweite, innere PCR. Für diesen Schritt wurde das „Taq PCR Master Mix“-Kit verwendet.

Die Nested PCR erfolgte nach diesem Schema:

1. 30 min. 45 °C
 2. 3 min. 95 °C

 3. 30 sec. 94 °C
 4. 30 sec. 50 °C
 5. 30 sec. 72 °C

 6. 10 min. 72 °C
 7. ∞ 4 °C
- ↑ 25 x

Um größere Genabschnitte des S-Segmentes sequenzieren zu können, wurden die im Gel positiv getesteten Proben erneut mit den RT-Primern „PU342F“ sowie „FU1102R“ in einer PCR amplifiziert. Im Thermocycler betrug diesmal die Anlagerungs-Temperatur 46 °C und die Elongationszeit eine Minute.

Ansatz für die Nested-PCR des S-Segmentes

(alle Chemikalien gehören zum „Taq PCR Master Mix“ Kit)

25 µl Taq PCR Master Mix

0,5 µl Primer „Pu390F“ (50 µM)

0,5 µl Primer „Pu 721R (50 µM)

2.2.6.3 PCR des partialen M – Segmentes

Für die M-Segment Analyse wurden 20 µl des RNA-Templates der positiv getesteten Mäuse mit 30 µl des oben genannten MasterMix gemischt. Für die in diesem Versuch benutzten Primer „M1“ und „M2“ wurde die PCR wie folgt durchgeführt:

1. 30 min. 45 °C
 2. 15 min. 95 °C

 3. 30 sec. 94 °C
 4. 30 sec. 50/55 °C
 5. 1 min. 72 °C

 6. 10 min. 72 °C
 7. ∞ 4 °C
- ↑ 45 x

Um größere Abschnitte des M-Segmentes sequenzieren zu können, wurde wie beim S-Segment auch noch einmal die PCR des partialen M-Segmentes mit RT-Primern durchgeführt. Als Primer dienten hier ebenfalls „M1“ und „M2“. Diese PCR wurde mit 35 Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C sowie einer Elongationszeit von einer Minute durchgeführt.

2.2.7 Nachweis der Amplifikate im Agarosegel

Die Auftrennung der DNA erfolgte im Agarosegel. Zur Herstellung dieses Gels wurde 0,5er „TBE“ hergestellt und mit 2%igem Agarosegel 2 min. bei 600 Watt gekocht und dann mit 40 µl Ethidiumbromid versetzt, bevor das Gemisch in die Gelkammer gegeben wurde. Nach vollständiger Polymerisation dieser Gelgrundlage im Gelbett wurde es mit Puffer überschichtet, der Kamm wurde entfernt und die entstandenen Taschen wurden mit jeweils 5µl PCR- Produkt und 5 µl Ladepuffer gefüllt. In eine Tasche wurde zum späteren Vergleich 6 µl einer DNA-Leiter (Mass Ladder Stock Solution) aufgetragen. Amplifikate wurden in diesem Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach getrennt, in diesen Versuchen betrug die Stromstärke 0,05 A. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel im UV-Licht analysiert und photographiert.

2.2.8 Cycle Sequencing und Aufreinigung

Die durchgeführte Sequenzreaktion basiert auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Im Unterschied zur PCR enthält der Reaktionsmix nur einen Primer, in unserem Fall 0,6 µl 5'-bzw. 3'-Primer. Dieser wurde mit 9,4 µl H₂O sowie 8,0 µl vom Sequenzier-Mastermix zusammengegeben. Zusätzlich zu den normalen Nukleotiden enthält der Mix auch vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide (Terminatoren) mit fehlender 3'-OH-Gruppe, die bei Einbau in die entstehende DNA-Kette zum Kettenabbruch führen. Das Verhältnis zwischen Nukleotiden und Didesoxynukleotiden ist so eingestellt, dass statistisch an jeder Position ein Kettenabbruch möglich ist. Die 18 µl vom entstandenen Gemisch wurden mit 2 µl der Proben aus der Nested PCR-Reaktion versetzt und die Reaktion wurde wie in der PCR in drei sich 25 Mal wiederholenden Schritten von Denaturierung (10 sec. bei 96 °C), Anlagerung (10 sec. bei 55 °C) und Elongation (3 min. bei 60 °C) durchgeführt.

Nach der Sequenzier-Reaktion wurden die nicht eingebauten Terminatoren, deren Anwesenheit bei der Analyse zu erheblichen Störungen führen würde, mittels Gelfiltration von den Produkten getrennt. Die Aufreinigung wurde mit dem „Qiagen Dye Ex 96 Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Schutzfolie wurde entfernt und die Platte in eine Auffangplatte gestellt. Zunächst wurde bei 1 min. bei 1000 rpm zentrifugiert, die Auffangplatte geleert und dann 300 µl Wasser auf

die Gelbetten gegeben. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, bevor 20 µl des Sequenzierproduktes auf die Mitte der Gelbetten der DyeEx-Platte gegeben wurde, die auf einer Mikrotiterplatte aufsaß. Die Mikrotiterplatte (96er- Format) war mit 0,2 ml Reaktionsgefäßen ohne Deckel bestückt. Nach 3 min. Zentrifugation bei 1000 rpm wurden die DyeEx-Platten verworfen und die Eluate konnten nun analysiert werden.

2.2.9 Digitalisierung und phylogenetische Analyse

Die Analyse erfolgte mit dem ABI 3100 AVANT-System. Dieses besteht aus einer Elektrophorese-Einrichtung mit Laser-Detektion und Computer. Fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide werden nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung über einen Laser detektiert und chronologisch digitalisiert. Mit Hilfe einer speziellen Software kann somit die Sequenz abgelesen und die Genotypisierung des Virus durchgeführt werden.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) verglichen sowie mit Hilfe des BIOEDIT-Programm zur Sequenzierung (Hall, 1999) einzeln auf ihre Richtigkeit kontrolliert. Die phylogenetischen Analysen wurden mit MrBayes 3.0 Programm (Ronquist et al., 2003) mit einem generalisierten reversiblen Zeitsubstitutionsmodell durchgeführt. Die phylogenetischen Bäume wurden mit dem TreeView Programm dargestellt (Page et al., 1996).

3. Ergebnisse

3.1 Mäusefang und Sektionen

Die Mäuse wurden vom 06.08.-09.08.2007 im Landkreis (LK) Aschaffenburg, vom 09.08.-10.08.2007 im LK Main–Spessart und vom 31.08.-02.09.2007 im Stadt- und Landkreis (StLK) Aachen gefangen. Die Fangorte befanden sich in älteren Mischwaldbeständen. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Fangorte in Hinsicht auf die Unterwuchsdichte, Bodenfeuchte und das Bestandsalter der Bäume möglichst ähnlich waren. Fangorte wie Sümpfe, Mulden oder Lichtungen wurden nicht ausgewählt. Im LK Aschaffenburg wurden 125 Fallen über drei Nächte aufgestellt (375 Fallennächte), im LK Main-Spessart 81 Fallen für eine Nacht (81 Fallennächte) und im StLK Aachen wurden zwei Nächte mit 160 Fallen gefangen (320 Fallennächte). Die Fallen wurden mit Speck bestückt und an umgefallenen Baumstümpfen oder im Unterholz aufgestellt, da diese Habitate den Kleinsäufern einen strukturreichen, geschützten Lebensraum bieten (Abbildung 12). Rötelmäuse halten sich maximal in einem Gebiet von 1000-7000 m² auf (Mazurkiewicz, 1983) und Gelbhalsmäuse in einem Gebiet von 3000-7000 m² (Kucera, 1970). Dementsprechend wurden die Abstände zwischen den Fangorten so gewählt, dass es keinem Tier möglich sein sollte, von einer in die andere Fläche zu gelangen. Die Fallen wurden abends aufgestellt und jeweils am darauf folgenden Morgen kontrolliert. Beim Leeren der Fallen wurde darauf geachtet, dass diese immer in der gleichen Reihenfolge kontrolliert wurden, damit keine Falle übersehen wurde. Im LK Aschaffenburg gab es sieben, im LK Main-Spessart zwei und im StLK Aachen acht Fangorte. Es wurden zwei verschiedene Mäusearten gefangen: Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*) und Rötelmäuse (*Myodes glareolus*). Die Zahl der gefangenen Kleinsäuger lag bei 108 und der Zustand war bei allen gut genug, um eine Bestimmung bis auf Speziesniveau durchzuführen.



Abbildung 12: Fangort 8 im LK Main-Spessart, der beispielhaft ein typisches Habitat (dichter Bewuchs und Totholz) für *M. glareolus* und *A. flavicollis* darstellt.

Tabelle 5: Übersicht über die Fänge der Nagetiere in den verschiedenen Landkreisen

Gat- tung	<u>Landkreis Aschaffenburg</u> 375 Fallennächte			<u>Landkreis Main- Spessart</u> 81 Fallennächte			<u>Stadt und Landkreis Aachen</u> 320 Fallennächte		
	Absolu- t	Index (in%)	Prozent (in%)	Absolut	Index (in%)	Prozent (in%)	Absolut	Index (in%)	Prozent (in %)
A. fl.	37	10	55	5	6	38	17	5	61
M. gl.	30	8	45	8	10	62	11	3	39
Gesamt	67	18	100	13	16	100	28	8	100

A.fl.: Apodemus flavicollis, M.gl.: Myodes glareolus

Absolut: Anzahl der gefangenen Mäuse in den angegebenen Fallennächten

Prozent: Prozent der gefangenen Gattung an der Gesamtzahl der gefangenen Kleinsäuger in diesem Landkreis

Index: Index-100-Fallennächte = Prozentanteil der gefangenen Mäuse im Verhältnis zu den Fallennächte (Fangnächte x Fallenzahl)

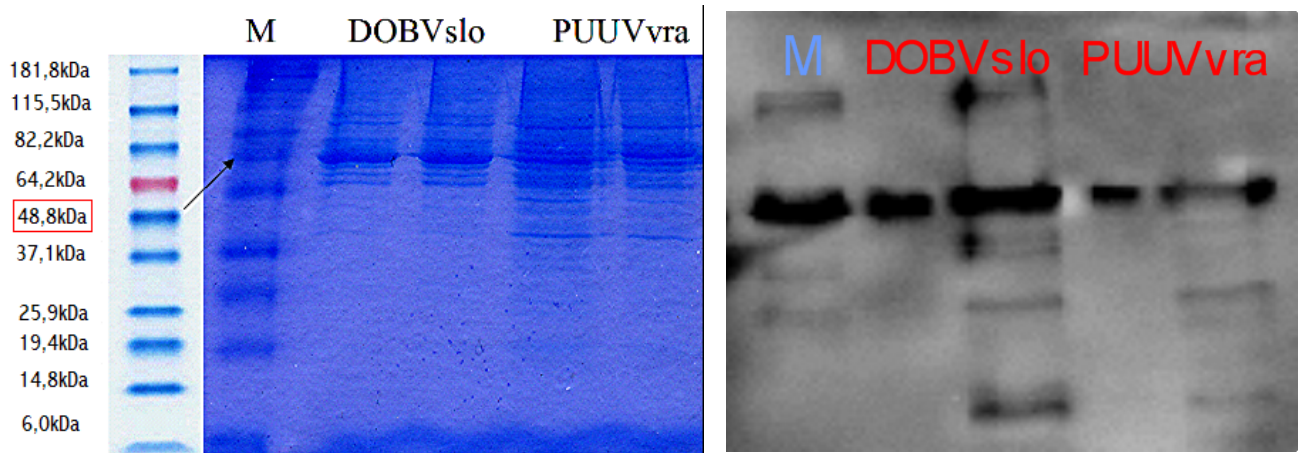
Der Index-100-Fallennächte zeigt, wie viele Mäuse im Verhältnis zu den aufgestellten Fallen gefangen wurden. Im LK Aschaffenburg war der Index mit einem Wert von 18% am höchsten, wohingegen er im StLK Aachen nur 8% betrug. Im LK Aschaffenburg und im StLK Aachen wurden mehr Gelbhalsmäuse gefangen, im LK Main-Spessart mehr Rötelmäuse. Bei den Sektionen konnten bei allen 108 gefangenen Mäusen Blut, die Lunge, das Herz, die Nieren und die Leber entnommen werden. Bei sechs Rötelmäusen und zwei Gelbhalsmäusen aus dem LK Aschaffenburg fehlte das Gehirn. Im StLK Aachen war dies bei fünf Gelbhalsmäusen der Fall. Außerdem fehlte bei zwei Gelbhalsmäusen aus dem LK Aschaffenburg die Milz. Das Fehlen dieser Organe kann auf Kannibalismus innerhalb der gleichen Spezies zurückgeführt werden.

3.2 Herstellung und Charakterisierung von hefeexprimierten Hantavirus-Nukleokapsidproteinen

Die kompletten N-Protein-kodierenden Sequenzen der PUUV-Vranica- (PUUV-Vra) und DOBV-Slovenia- (DOBV-Slo) Stämme waren in den Hefevektor pFX7-His kloniert worden (Razanskiene, 2004). Der Hefevektor enthält eine Hexahistidin-Sequenz, sodass eine Fusion aus dem N-Protein und einem N-terminalen Hexahistidin-Schwanz (His6) exprimiert werden konnte. Der Hexahistidin-Schwanz war nötig für die darauf folgende Reinigung per Nickelchelat-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.2.2). Die verwendeten Hefestämme waren *Saccharomyces cerevisiae* „gh4c“ bzw. „gcn2“. Im SDS-Polyacrylamidgel wanderten die gereinigten N-Proteine entsprechend ihrem vorhergesagten Molekulargewicht von ca. 48,8 kD und reagierten im Immunoblot mit einem polyklonalen Kaninchenserum. Die Kaninchen waren zuvor mit PUUV-N immunisiert worden, um polyklonale Antikörper gegen die N-Proteine der Hantaviren zu bilden (Razanskiene, 2004). Sowohl im coomassieblau-gefärbten Gel als auch beim Immunoblot konnten

die gereinigten N-Proteine sauber dargestellt werden (siehe Abb. 13), da nur wenige zusätzliche Banden zu sehen waren.

Abbildung 13: Nachweis von gereinigten N-Proteinen



Der Nachweis von gereinigten N-Proteinen im coomassieblau-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (linkes Bild) sowie im Immunoblot (rechtes Bild) zeigt, wie erwartet, ein Molekulargewicht von ca. 48,8 kDa für die hefeexprimierten und mittels Nickel-Chelat aufgereinigten N-Proteine von DOBVslo und PUUVvra.

3.3 Nachweis von hantaviruspezifischen Antikörpern im Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (EIT)

Zum Nachweis von Hantavirus-spezifischen Antikörpern wurden die Seren der gefangenen Gelbhals- und Rötelmäuse im IgG-EIT (Enzymimmuntest) getestet. Als Antigene dienten die hefeexprimierten, gereinigten N-Proteine von PUUVvra und DOBVslo. Von den 108 gefangenen Tieren konnten von drei Gelbhalsmäusen und einer Rötelmaus aus dem LK Aschaffenburg sowie bei zwei Gelbhalsmäusen aus dem SK/LK Aachen nicht genügend Transsudat gewonnen werden, um eine Serologie durchzuführen. Somit standen noch 102 Proben für den Antikörpernachweis zur Verfügung, wovon 63 Proben von Mäusen aus dem LK Aschaffenburg, 13 von Mäusen aus dem LK Main-Spessart und 26 von Mäusen aus dem StLK Aachen waren.

Tabelle 6: Enzymimmunttest – Ergebnisse der Untersuchung von *A. flavicollis* – und *M. glareolus* – Transsudaten

	<u>LK Aschaffenburg</u>						<u>LK Main-Spessart</u>						<u>SK/LK Aachen</u>					
	<u>PUUV</u>			<u>DOBV</u>			<u>PUUV</u>			<u>DOBV</u>			<u>PUUV</u>			<u>DOBV</u>		
	<u>x</u>	<u>+</u>	<u>%</u>	<u>x</u>	<u>+</u>	<u>%</u>	<u>x</u>	<u>+</u>	<u>%</u>	<u>x</u>	<u>+</u>	<u>%</u>	<u>x</u>	<u>+</u>	<u>%</u>	<u>x</u>	<u>+</u>	<u>%</u>
A.fl.	34	2	5,9	34	2	5,9	5	0	0	5	0	0	15	1	6,7	15	0	0
M.gl.	29	8	27,6	29	6	20,7	8	3	37,5	8	2	25	11	2	18,2	11	2	18,2
Gesamt	63	10	15,9	63	8	12,7	13	3	23,1	13	2	15,4	26	3	11,5	26	2	11,5

A.fl.: *A.flavicollis*, *M.gl.*: *Myodes glareolus*

x: Anzahl der getesteten Mäuse dieser Gattung

+: Anzahl der positiv getesteten Mäuse

%: prozentualer Anteil der positiv getesteten Mäuse an der Gesamtzahl der getesteten Mäuse

Bei insgesamt 16 von 102 Tieren (15,7%) konnten im EIT anti-PUUV-spezifische IgG Antikörper nachgewiesen werden. 15,9% der getesteten Kleinsäuger aus dem LK Aschaffenburg waren im PUUV-EIT, 23,1% der Mäuse waren aus dem LK Main-Spessart und 11,5% aus dem SK/LK Aachen reaktiv. Wie der Tabelle 6 zu entnehmen ist, waren viele der im PUUV-EIT positiv getesteten Mäuse auch im DOBV-EIT reaktiv. Mit drei Ausnahmen stammen die reaktiven Proben von Rötelmäusen, dem natürlichen Wirt des PUUV. Zur Bestätigung der im EIT reaktiven Seren wurde ein ImmunoBlot (IB) durchgeführt. Die positiven Ergebnisse des EIT bestätigten sich im IB für alle Rötelmaus-Transsudate. Lediglich bei einer Probe war nicht mehr genügend Transsudat vorhanden, um den IB durchzuführen. Von den drei Transsudaten der Gelbhalsmäuse, die im EIT positiv getestet wurden, war nur eines im IB reaktiv (siehe Tabelle 8).

3.4 Ergebnisse der Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT – PCR)

Für die RT-PCR wurden alle Lungenproben der gefangenen Rötelmäuse ausgewählt. Auch die Proben, die im EIT und IB nicht reaktiv gewesen waren, wurden erneut getestet, um serologisch negative aber RT-PCR positive Proben erfassen zu können. Zusammen mit der in der Serologie positiv getesteten Gelbhalsmaus ergaben dies 48 zu testende Proben. 29 der Proben stammten von Mäusen aus dem LK Aschaffenburg, acht aus dem LK Main-Spessart und elf aus dem StLK Aachen. Das RT-PCR-Screening erfolgte mit spezifischen Primern für die PUUV-S- und M-Segmente (siehe Abschnitt 2.2.6).

Tabelle 7: Ergebnisse der PCR vom S – und Nested S – Segment sowie dem M – Segment

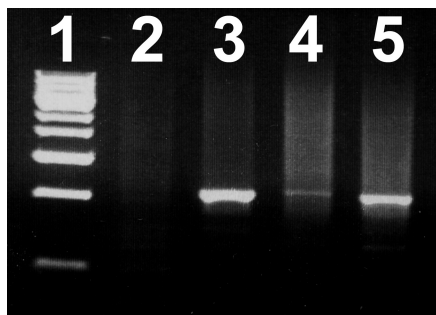
Landkreis	Gattung	S-Segment			Nested S-Segment und M-Segment				
		x	+	%	x	Nested +	%	M-Segment+	%
LK Aschaffenburg	<i>M. glareolus</i>	28	8	28,6	8	2	25	5	62,5
	<i>A. flavicollis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
LK Main-Spessart	<i>M. glareolus</i>	8	3	37,5	3	1	33,3	1	33,3
StLK Aachen	<i>M. glareolus</i>	11	1	9,1	1	1	100	1	9,1

In der PCR getestet wurden die Mäuse der Gattung *M. glareolus* sowie eine reaktive *A. flavicollis*.

- x: Absolute Anzahl der untersuchten Mäuse im jeweiligen Landkreis
 +: im jeweiligen Untersuchungszyklus positiv getestete Proben
 Nested +: bei den in der S-Segment-PCR positiv getesteten Proben wurde versucht, mittels Nested-S-Segment-PCR einen größeren Abschnitt des S-Segmentes zu amplifizieren
 %: prozentualer Anteil der positiven an der Anzahl der getesteten Proben

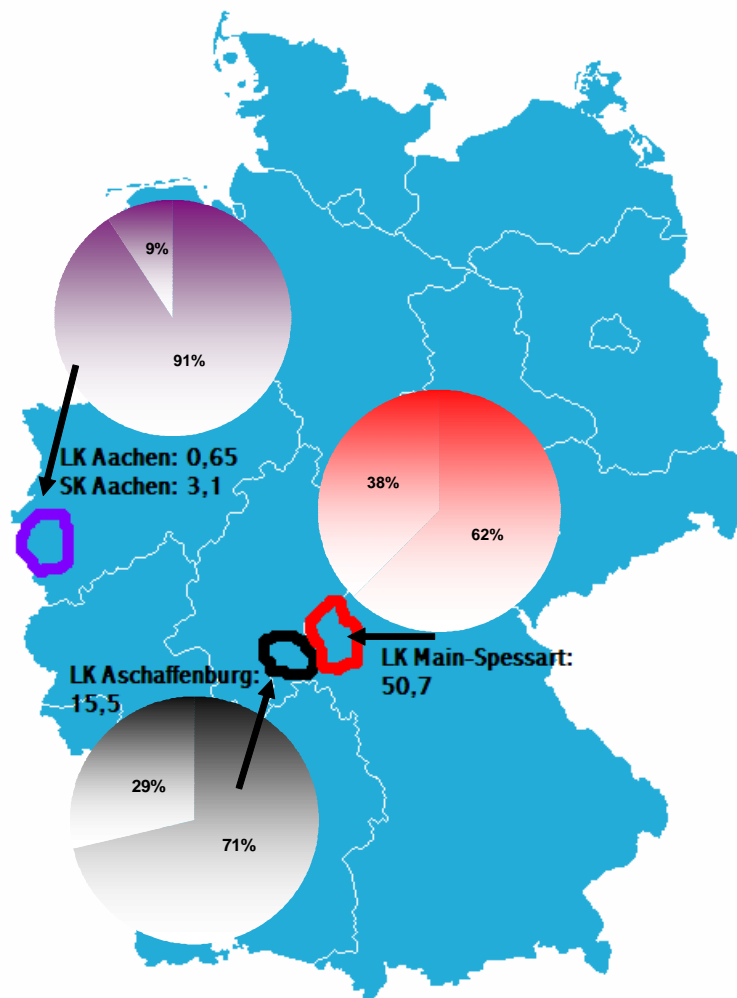
Insgesamt konnte in der RT-PCR der S-Segmente bei zwölf Mäusen hantavirale Nukleinsäure nachgewiesen werden. Die zwölf Proben stammten alle von Mäusen der Spezies *M. glareolus*. Acht der zwölf positiven Mäuse wurden im LK Aschaffenburg gefangen, drei im LK Main-Spessart und eine im StLK Aachen (siehe Tabelle 7). Wenn man dies im Verhältnis zur Anzahl der getesteten Rötelmäuse (*M. glareolus*) betrachtet, war die Prävalenz unter den Rötelmäusen im LK Main-Spessart mit 37,5% am höchsten, gefolgt von 28,6% im LK Aschaffenburg und 9,1% im SK/LK Aachen. Wie die Tabelle 8 zeigt, waren sieben von zwölf (58,3%) der Virusträger männlich und die restlichen fünf Virusträger (41,7%) weiblich.

Abbildung 14: Nachweis PUUV – spezifischer RNA in einer Lungenprobe mittels RT – PCR und nachfolgender Sichtbarmachung der Amplifikationsprodukte in einem 2.5% Agarose Gel



- 1 = Marker
 2 = Negativkontrolle
 3 = Stark positive Kontrolle
 4 = Schwach positive Kontrolle
 5 = Positive Probe

Abbildung 15: Übersicht über die Inzidenzen in den jeweiligen Landkreisen im Jahr 2007 und Vergleich der Anzahl der getesteten Rötelmäuse zur Anzahl der positiven Tiere (in der RT – PCR des S – Segmentes)



Blau umrandet ist schemenhaft der Stadt- und LK Aachen dargestellt, schwarz umrandet der LK Aschaffenburg und rot umrandet der LK Main-Spessart.

Gut zu sehen ist, dass im LK Main-Spessart im Jahr 2007 mit einer Inzidenz von 50,7 besonders viele Personen an Hantavirusinfektionen erkrankt sind und dort auch die Prävalenz unter den Rötelmäusen besonders hoch war. Drei von acht getesteten Rötelmäusen (37,5%) waren hier positiv. Im LK Aschaffenburg waren acht von 28 getesteten Mäusen positiv (28,6%), im SK/LK Aachen eine von elf (9,1%) (vergleiche auch Tabelle 7).

Von den Lungenproben, die in der S-Segment-RT-PCR positiv gewesen waren, wurde daraufhin versucht, einen größeren Teil des S-Segmentes in der S-Segment-nested-RT-PCR zu amplifizieren. Dies gelang bei zwei Mäusen aus dem LK Aschaffenburg und jeweils einer Maus aus den Landkreisen Main-Spessart und Aachen. Außerdem wurden mit der M-Segment-RT-PCR bei fünf Mäusen aus dem LK Aschaffenburg sowie bei jeweils einer Maus aus den LK und StLK Main-Spessart und Aachen PUUV-spezifische RNA nachgewiesen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 8: Gesamtübersicht über die Ergebnisse der Serologie (EIA und Western Blot) sowie der RT-PCR für die Mäuse der Spezies *M. glareolus* und einer reaktiven Maus der Spezies *A. flavicollis*

Nr.	S.-Nr.	Sex	Landkreis	Fangort	Spezies	PUUV		DOBV		PCR
						ELISA	WB	ELISA	WB	
1	77	m	LK Main-Spessart	Rechtenbach, SR	M.g.	2,306	pos.	0,953	pos.	pos.
2	82	f	LK Main-Spessart	Rechtenbach, SR	M.g.	2,4	pos.	0,294	pos.	pos.
3	85	f	LK Main-Spessart	Rechtenbach, Gaulberg	M.g.	1,63	pos.	0,074	pos.	pos.
4	90	f	LK Aschaffenburg	Laufach, Metzberg 1	M.g.	0,406	neg.	0,364	neg.	neg.
5	104	m	LK Aschaffenburg	Laufach, Miesberg	M.g.	0,418	pos.	0,559	pos.	pos.
6	117	m	LK Aschaffenburg	Laufach, Miesgrund 5	M.g.	2,064	pos.	1,904	pos.	pos.
7	118	m	LK Aschaffenburg	Laufach, Miesgrund 4	M.g.	1,817	pos.	1,08	pos.	pos.
8	119	m	LK Aschaffenburg	Laufach, Metzberg 2	M.g.	0,333	n. d.	0,135	n. d.	pos.
9	124	f	LK Aschaffenburg	Laufach, Metzberg 3	M.g.	2,397	pos.	2,386	pos.	pos.
10	125	m	LK Aschaffenburg	Laufach, Miesgrund 5	M.g.	1,776	pos.	0,125	pos.	pos.
11	132	m	LK Aschaffenburg	Laufach, Metzberg2	M.g.	2,29	pos.	0,203	pos.	pos.
12	133	f	LK Aschaffenburg	Laufach, Miesgrund 4	M.g.	1,148	pos.	2,53	pos.	pos.
13	139	m	LK Aschaffenburg	Laufach, Metzberg 3	A. fl.	1,848	pos.	1,04	pos.	neg.
14	172	f	Kreis Aachen	Sief, FH Magelspfad	M.g.	0,734	pos.	0,621	pos.	pos.
15	177	m	Stadt Aachen	AC Stadtwald, Hitfeld	M.g.	0,95	pos.	1,281	pos.	neg.
						Cut-off PUUV: 0,170		Cut-off DOBV: 0,140		

S.-Nr.: Serum-Nummer, m: männlich, w: weiblich, n.d.: nicht durchführbar, da nicht genügend Transsudat gewonnen werden konnte, SR: Schwarzer Rück, AC Stadtwald: Aachener Stadtwald, M.g.: *Myodes glareolus*
Cut-off: Grenzwert, ab dem die Proben als positiv gewertet werden (berechnet aus dem Mittelwert der Negativkontrollen plus der fünfmaligen Standardabweichung)

3.5 Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse der S – sowie der M – Segmente

3.5.1 Analyse der PUUV-S-Segment-Sequenzen

Um die Verwandtschaftsbeziehungen der S-Segment-Nukleotid-Sequenzen der PUUV-RT-PCR-Produkte aus den Landkreisen Aschaffenburg, Main-Spessart und Aachen zu anderen Sequenzen darzustellen, wurden die positiven Proben sequenziert. Daraufhin folgte der Vergleich mit bereits publizierten PUUV-S-Segment-Sequenzen aus Deutschland und anderen Regionen Europas. Für die Erstellung der Nukleotid-Vergleiche wurden die von uns sequenzierten PUUV-Sequenzen *Laufach133* und *Aachen172* ausgewählt, um unter der Verwendung von BioEdit und ClustalX (siehe Abschnitt 2.2.9) prozentuale Vergleiche zu den anderen Sequenzen herzustellen. Die höchste Ähnlichkeit zur Sequenz *Laufach133* zeigen die Sequenzen aus Bayern (*BavariaCG9/04*) und Heidelberg (*Heidelberg/hu*) (siehe Tabelle 9). Sie sind zu 89% identisch zur Sequenz *Laufach133* und zeigen somit eine Divergenz von 11%. Zu Sequenzen aus West- und Nordwestdeutschland (*CologneMu05/258*, *Berkel*) betragen die Divergenzen 16% und zu Sequenzen aus Umea in Schweden (*Umea/hu*) besteht eine Divergenz von 18%. *Aachen172* clustert eng mit den Köln-Sequenzen (*CologneMu05/272*), die Nukleotidesequenzen sind zu 93% identisch. Zu der Sequenz *Laufach133* besteht eine Divergenz von 14% und zu Sequenzen aus Bayern (*BavariaCG 34/04*) und Berkel (*Berkel*) in Norddeutschland 15%. Die Divergenz zu Fangorten außerhalb Deutschlands war erneut größer, beispielsweise 17% zu einer Sequenz aus Umea (*Umea/hu*).

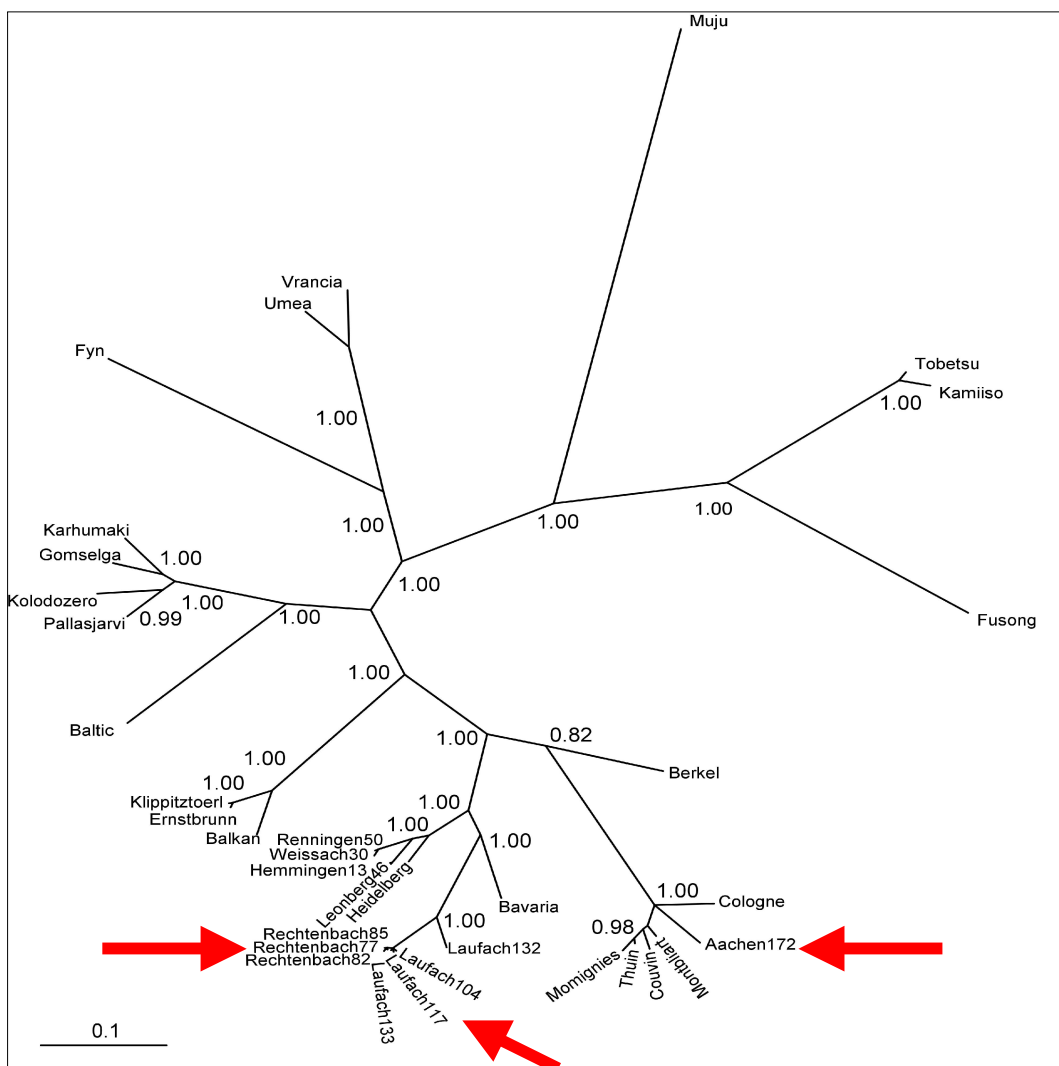
Tabelle 9: Vergleich der Nukleotid – Sequenz – Identitäten (in %) der PUUV – S – Sequenzen Laufach133 und Aachen172 mit publizierten Sequenzen aus Deutschland und anderen europäischen Ländern

Laufach133		Aachen 172	
S-Segment		S-Segment	
Virus-Stamm	727 Nukleotide	Virus-Stamm	268 Nukleotide
Bayern (Bavaria CG)	89%	Köln (Cologne Mu)	93%
Heidelberg	89%	Laufach (Laufach133)	86%
Berkel (Berkel)	84%	Bayern (Bavaria CG)	85%
Köln (Cologne)	84%	Berkel (Berkel)	85%
Umea (Umea/hu)	82%	Umea (Umea/hu)	83%

Ein unter Verwendung des Phylogenie Programms MrBayes berechneter phylogenetischer Baum verdeutlicht die Verwandtschaftsbeziehungen der einzelnen Sequenzen zueinander. Die von unseren Ergebnissen dargestellten Sequenzen sind *Rechtenbach 77*, *82* und *85* aus dem LK Main-Spessart,

Laufach 104, 117, 132 und 133 aus dem LK Aschaffenburg und *Aachen172* aus dem SK/LK Aachen (siehe Abbildung 16). Der phylogenetische Baum zeigt, dass es klar getrennte genetische Linien der PUUV-S-Sequenzen gibt, die sich geographisch zuordnen lassen. Innerhalb Deutschlands können die Sequenzen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe umfasst Sequenzen aus Süddeutschland wie zum Beispiel *Bayern, Renningen, Laufach* und *Rechtenbach*. Zu der zweiten Gruppe gehören die Sequenzen aus West- und Nordwest-Deutschland (*Aachen, Köln, Berkel*) sowie die belgischen Sequenzen (*Momignies, Thuin, Couvin* und *Montbliart*).

Abbildung 16: Bayesian-basierter phylogenetischer Baum der partiellen PUUV-S-Segment Sequenzen der Nagetiere von verschiedenen Fangorten in Deutschland, Europa und Asien



In den Klammern sind die einzelnen Zugangsnummern (Accession-Nummern) zu den Sequenzen angegeben. Berkel(L36943.1), CologneMu05/258(DQ322675.1), Montbliart(AJ277031), Couvin(AJ277034), Thuin(AJ277032), Momignies(AJ277032), BavariaCG9/04(AY954722.1), Laufach132(EU246965), Laufach104 (EU246963), Laufach117(EU246964), Laufach133(EU24962.1), Rechtenbach82(EU246967), Rechtenbach77(EU246966), Rechtenbach85(246968), Heidelberg/hu(DQ094844.1), Leonberg46(EU085564), Hemmingen13(EU085558), Weissach30(EU085561), Renningen50(EU085565), Balkan(AJ314600), Ernstbrunn (AJ888753), Klippitztoerl(AJ888751), Baltic(AJ314599), Pallasjarvi(AJ314597), Kolodozero(AJ238789), Gomselga(AJ238790), Karhumaki(AJ238788), Fyn(AJ238791), Umea/hu,Schweden(AY526219), Vranica/Hällnas(U14137), Muju(DQ138133), Tobetsu(AB010731), Kamiiso(AB010731), Fusong(EF442091).

Es wird deutlich, dass sich die Nukleotid-Sequenzen aus dem Spessart (*Laufach104,117,132,133 und Rechtenbach77,82,85*) klar von den bisher bekannten Sequenzen unterscheiden und getrennt als eigene PUUV-Sublinie clustern. Die Sequenz aus Aachen bildet mit den Sequenzen aus Belgien und Köln (*Cologne*) einen eigenen Zweig. Anhand des phylogenetischen Baumes wird veranschaulicht, wie unterschiedlich die deutschen Sequenzen zu denen aus Südkorea, Nord- und Osteuropa sind. Beispiele dafür sind die Sequenzen aus *Vranica* (Kroatien), der baltischen Region (*Baltic*) und *Muju* (Südkorea).

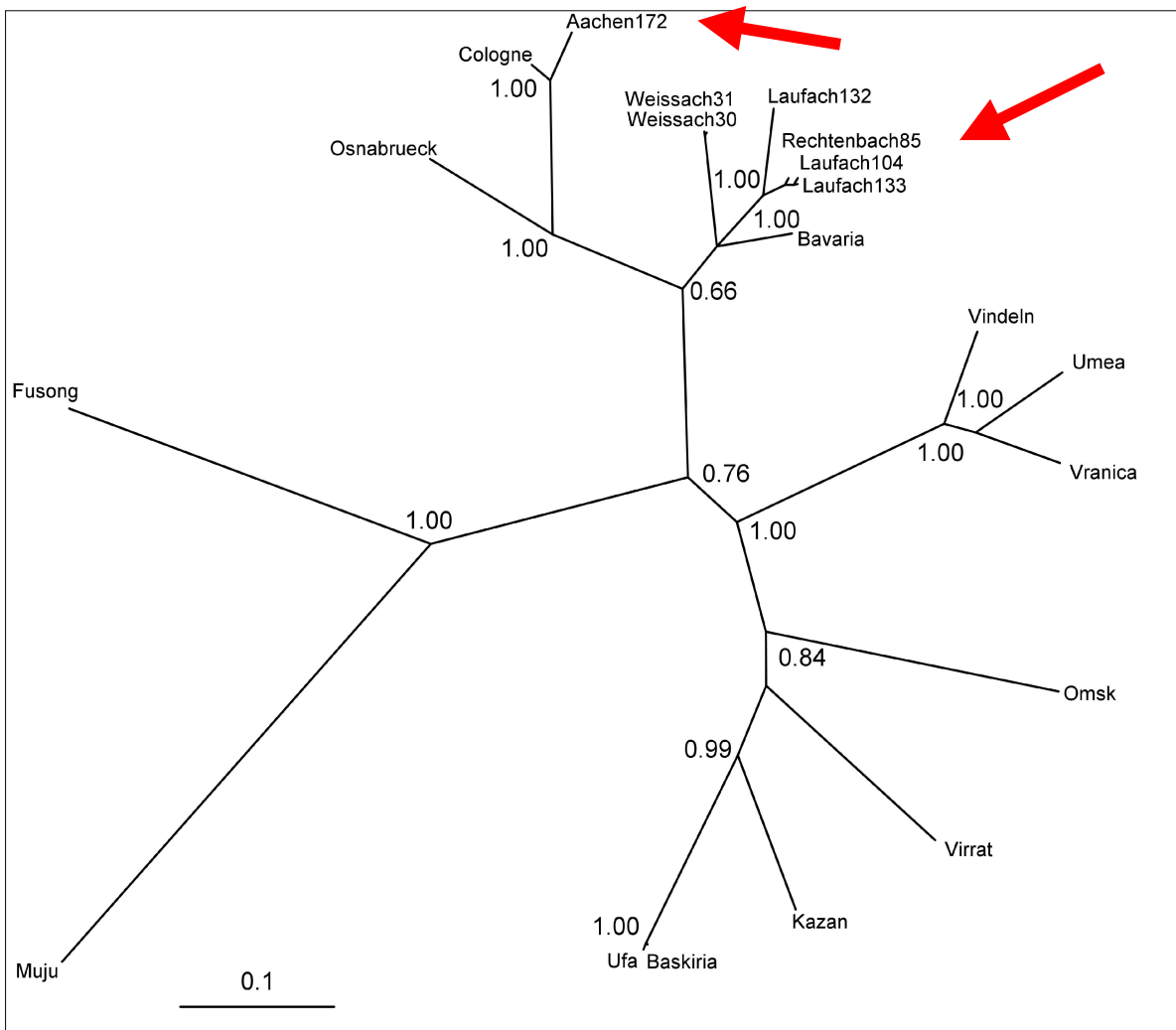
3.5.2 Analyse der PUUV-M-Segment-Sequenzen

Die sequenzierten partiellen M-Segmente der PUUV Linien *Laufach133* und *Aachen172* wurden ebenfalls mit bekannten Sequenzen aus anderen Teilen Deutschlands sowie Europas verglichen. Auch hier zeigen die geographisch näher aneinander liegenden Sequenzen mehr Ähnlichkeit zueinander als die weiter entfernt gelegenen Sequenzen. Die Sequenz *Laufach133* ist beispielsweise mit 9% wenig divergent zu Sequenzen aus Bayern und Baden-Württemberg (*BavariaCG157/05, Weissach31*). Mit 13% ist die Divergenz zu einer Sequenz aus Osnabrück (*Osnabrueck Mu05/392*) höher. Am weitesten entfernt zu *Laufach133* clustern Sequenzen aus Köln (16%) und Umea (17%). Die Sequenz aus Aachen (*Aachen172*) zeigt wie schon im S-Segment-Vergleich, dass sie eng mit den Sequenzen aus Köln assoziiert ist (Divergenz von 4%). Zu *Weissach31* besteht bei ihr eine Divergenz von 14% und zu *BavariaCG157/05* eine Divergenz von 15%. Die größte Divergenz betrug 18 % und bestand erneut zu der Sequenz aus Schweden (*Umea/hu*).

Tabelle 10: Vergleich der Nukleotid – Sequenz-Identität (in %) der beschriebenen PUUV-M-Sequenzen mit publizierten Sequenzen aus Deutschland und anderen europäischen Ländern

Laufach 133		Aachen 172	
M-Segment		M-Segment	
Virus-Stamm	448 Nukleotide	Virus-Stamm	472 Nukleotide
Bayern (Bavaria CG 157/05)	91%	Köln (Cologne Mu05/269)	96%
Weissach (Weissach 31)	91%	Osnabrück (OsnabrueckMu05/392)	87%
Osnabrück (OsnabrueckMu05/392)	87%	Weissach (Weissach 31)	86%
Köln (Cologne mu05/161)	84%	Bayern (Bavaria CG 159/05)	85%
Umea (Umea/hu)	83%	Umea (Umea/hu)	82%

Abbildung 17: Bayesian – basierter phylogenetischer Baum der verschiedenen partiellen M – Segmente



OsnabrückMu05/392(DQ518217.1), CologneMu05/161(DQ518215.1), Weissach31(EU250756), Weissach30(EU250755), Laufach132(EU246970), Rechtenbach85(EU246972), Laufach104(EU246969), Laufach133(EU246971), BavariaCG157/05(DQ518232), Vindeln(AJ223382), Umea/hu(AY526218.1), Vranica(U14136), Omsk(EU562988), Virrat(Z69985), Kazan(Z84205), Ufa Baskiria(AJ552614), Muju(DQ138141), Fusong(EF422372).

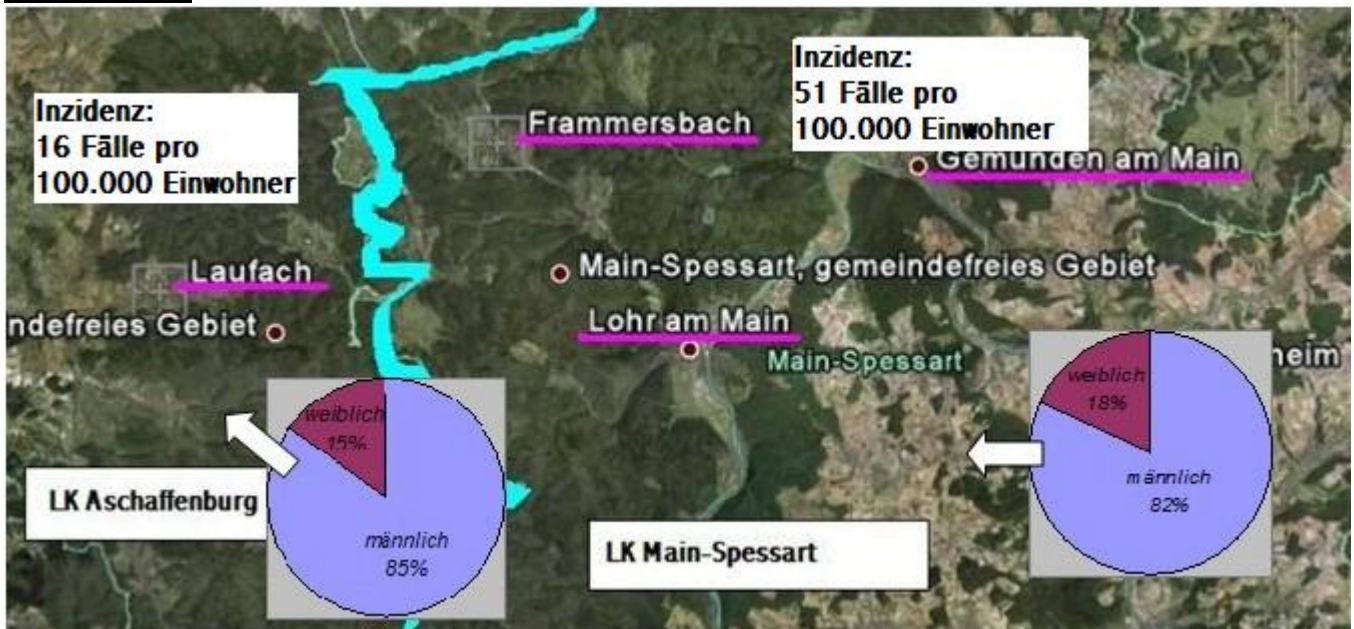
Die phylogenetische Analyse des partiellen M-Segmentes zeigt wiederum eine geographische Aufteilung der Sequenzen. Die Sequenzen aus Asien sind weit separiert von den anderen Sequenzen. Auch verschiedene europäische Sequenzen wie z.B. *Umea/hu*, *Vranica* oder *Kazan*, die geographisch in Skandinavien, Russland, dem Balkan und Zentraleuropa anzuordnen sind, zeigen große Divergenzen zu deutschen Sequenzen. Sie clustern in eigenen Gruppen. In Deutschland bilden sich, wie schon beim S-Segment beobachtet, wieder zwei Untergruppen heraus: Eine in Nordwest- und Westdeutschland (*Osnabrück*, *Köln*, *Aachen*) und die andere in Süd-Ostdeutschland (*Spessart*, *Weissach*, *Bayern*). Es wird deutlich, dass die Sequenzen aus dem Spessart (*Laufach*, *Rechtenbach*) eine gut abgrenzbare Gruppe bilden. Sie clustern lediglich noch mit weiteren Sequenzen aus Bayern und Baden-Württemberg, mit denen sie zusammen eine eigene genetische Linie bilden. Die Sequenz aus Aachen bildet mit Köln eine Gruppe, die zusätzlich einer Sequenz

aus Osnabrück nahe steht. In Deutschland bilden sich somit zwei klar getrennte genetische Linien heraus, die eine PUUV-Nukleotid-Divergenz von bis zu 16% im S-Segment und 15% im M-Segment zwischen Süd- und Nordwest-Deutschland zeigen.

3.6. Epidemiologische Auswertung der an Hantavirus erkrankten Personen in den Landkreisen Aschaffenburg und Main – Spessart

Aus dem Landkreis Main-Spessart wurden im Jahr 2007 insgesamt 66 humane Hantavirus-Erkrankungen gemeldet. 54 Patienten (82%) waren männlich, 12 (18%) waren weiblich. 54 Patienten (68%) waren im Alter zwischen dreißig und sechzig Jahren. Besonders viele Menschen hatten sich in der Nähe der Orte Lohr, Gemünden und Frammersbach infiziert (Stadtgesundheitsamt Main-Spessart, unveröffentlichte Daten). Die Hälfte der Patienten musste stationär behandelt werden. Bei über 70% der Patienten konnten Kopfschmerzen, Fieber, Gliederschmerzen, Rückenschmerzen sowie klopfschmerzhaftes Nierenlager diagnostiziert werden. Auch Übelkeit und Erbrechen waren häufige Symptome. Außerdem litten 15 Patienten (22%) an Durchfall und zwölf Patienten (15%) an Atembeschwerden.

Abbildung 18: Übersicht über die Orte in den Landkreisen Aschaffenburg und Main-Spessart, in denen im Jahr 2007 besonders viele Menschen an einer Hantavirusinfektion erkrankt sind



Linie türkis: Grenze zwischen den Landkreisen

Linien violett: Orte, in denen besonders viele Hantavirusinfektionen auftraten

Gut zu sehen ist, dass diese Orte alle in ländlichen Regionen liegen. Die Kreisdiagramme zeigen, dass in beiden Landkreisen im Jahr 2007 mehr Männer als Frauen erkrankt sind.

Im LK Aschaffenburg erkrankten 27 Patienten im Jahr 2007 an einer Hantavirusinfektion. 23 davon (85%) waren männlich und vier (15%) waren weiblich. 18 Patienten (67%) waren im Alter zwischen 30 und 60 Jahren. Außer zwei Personen, die angaben, in kleinstädtischen Gebieten zu wohnen (< 20.000 Einwohner), lebten alle Patienten in ländlichen/dörflichen Gebieten (Stadtgesundheitsamt Aschaffenburg, unveröffentlichte Daten). Alle erkrankten Personen in diesem Landkreis wohnten weniger als 100 Meter von einer Wiese, einem Wald oder einem Acker entfernt. Insgesamt acht (28%), der mit Hantavirus infizierten Patienten, kamen aus dem Ort Laufach, die restlichen Infektionen verteilten sich auf die übrigen Orte im Landkreis. 17 Patienten (63%) gaben an, innerhalb der letzten vier Wochen vor den ersten Krankheitssymptomen mit Holz (Holz hacken, umschichten etc.), im Garten oder in der Land- und Forstwirtschaft gearbeitet zu haben. Zwei Drittel der befragten Patienten hatten, ebenfalls innerhalb des letzten Monats, den Keller, die Scheune oder einen Dachboden ausgekehrt oder aufgeräumt. Im Wald joggen, spazieren oder Fußball spielen waren 14 Patienten (52%) gewesen.

Auch im Landkreis Aschaffenburg musste die Hälfte der Patienten im Durchschnitt für sieben Tage im Krankenhaus behandelt werden und zwei Patienten wurden aufgrund von starken Ödemen und Atemnot auf die Intensivstation verlegt. Ein Patient wurde wegen einem akuten Nierenversagen und Anurie dreimal für zwei Stunden dialysiert. Die Symptome waren vergleichbar mit den genannten Symptomen aus dem LK Main-Spessart, jedoch stieg die Zahl der Patienten mit Atemnot auf 21% an. Die Seren der Patienten zeigten außer einer starken Reaktivität im EIA auf PUUV-IgG und IgM in vielen Fällen auch eine schwache Reaktivität auf Hantaan-IgG und IgM.

4. DISKUSSION

4.1 Die zunehmende Bedeutung von Hantaviren in Deutschland

Seit der Einführung der Meldepflicht für Hantaviren im Jahr 2001 war die Zahl der registrierten Hantaviruserkrankungen in Deutschland im Jahr 2007 so hoch wie noch nie zuvor. Während in den vergangenen Jahren die Zahl der registrierten Fälle im Durchschnitt bei 220 lag, wurden dem Robert-Koch-Institut im Jahr 2007 1688 Fälle gemeldet. Die Inzidenz war vier Mal so hoch wie jene im Jahr 2005 (0,54 Erkrankungen/100.000 Einwohner), als die bisher höchste Erkrankungszahl in Deutschland beobachtet wurde. Die am meisten betroffenen Gebiete waren die Schwäbische Alb, der Bayerische Wald, der Spessart und das Münsterland. 2007 gehörten Hantavirus-Erkrankungen gemeinsam mit Erkrankungen durch Noroviren und Rotaviren sowie Influenza und Hepatitis C zu den fünf häufigsten, namentlich meldepflichtigen, Viruserkrankungen (RKI, 2008/1). Es bestand somit die dringende Notwendigkeit, die in den Ausbruchgebieten zirkulierenden Hantaviren genauer zu analysieren. Unsere Studie wurde in Zusammenarbeit mit dem Netzwerk „Nagetierübertragene Pathogene“ (Ulrich et al., 2009) durchgeführt, das interdisziplinäre Untersuchungen zur Nagetierpopulationsdynamik, Prävalenz und Evolution von Hantaviren und deren Auswirkungen auf die Häufigkeit humaner Infektionen untersucht.

Aus Deutschland gab es zuvor publizierte Sequenzen von PUU-Viren aus Bayern (Essbauern et al., 2006), Baden-Württemberg (Kimmig et al., 2001), Nordrhein-Westfalen (Essbauer et al., 2007), Schleswig-Holstein und Rheinland-Pfalz (Schilling et al., 2007). In acht von sechzehn Bundesländern konnten bereits Puumalaviren nachgewiesen werden (Schlegel, 2007). Misch- und Laubwälder, vor allem Buchenbestände sind in ganz Deutschland weit verbreitet. Da diese Waldgebiete typische Lebensräume der Rötelmaus darstellen (Niethammer und Krapp, 1978) und die Rötelmaus als Primärwirt für das PUUV gilt, ist mit einem Vorkommen des Rötelmaus-assoziierten PUUV in ganz Deutschland zu rechnen. In unserer Studie konnte das Vorkommen von Hantaviren im Spessart sowie in Aachen erstmalig bestätigt werden. Es wurden Mäuse in den Landkreisen Aschaffenburg, Main-Spessart und Aachen gefangen und untersucht. Diese Fangorte wurden ausgewählt, da bereits Mitte des Jahres 2007 hohe Zahlen von Hantavirus-Erkrankungen in den untersuchten Landkreisen gemeldet worden waren und das Interesse bestand, Daten über die zirkulierenden Hantavirus-Spezies in den lokalen Nagetierpopulationen zu erhalten. Neue PUUV-Sublinien wurden im Rahmen unserer Studie charakterisiert, die für die massive Zunahme der Hantavirus-Infektionen in diesen Gebieten im Jahr 2007 verantwortlich gewesen waren.

4.2 PUU – Viren als auslösendes Agens für den Ausbruch im Jahr 2007

Die Menschen in den von uns ausgewählten Bezirken waren ausschließlich an „*Nephropathia epidemica*“ erkrankt, was durch das PUUV ausgelöst wird. Somit lag die Vermutung nahe, dass PUU-Viren für den Anstieg von Hantaviruserkrankungen im Jahr 2007 verantwortlich gewesen waren. Beim Mäusefang wurde deshalb besonderer Wert auf den Fang von Rötelmäusen (*M. glareolus*) gelegt, dem natürlichen Wirt des PUUV in Deutschland. Das Serum aller gefangenen Kleinsäuger wurde im EIA auf das Vorhandensein von IgG-Antikörpern untersucht. Zu 81% stammten die reaktiven Proben von Mäusen der Spezies *M. glareolus*. Aus dem Lungengewebe aller *M. glareolus* und einer positiven *A. flavicollis* wurde versucht, hantavirale RNA zu isolieren. Das Ergebnis wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) geprüft. Lungengewebe wurde für die Isolation verwendet, da dies evidenzbasiert die effektivste Methode darstellt, um Hantaviren zu detektieren (Bowen et al., 1997; Lundkvist et al., 1998; Sironen et al., 2002; Dekonenko et al., 2003). Auch andersartige Gewebe wie Herz oder Nieren hätten für die PCR-Untersuchung herangezogen werden können. In diesen Organen ist jedoch die Viruslast geringer, was den Nachweis der Viren erschwert. Von den 48 getesteten Proben wurden in der PCR bei zwölf Proben hantavirale Nukleinsäure nachgewiesen und die positiven Proben konnten alle als PUUV-Sequenzen identifiziert werden. Eine solche molekulare Diagnostik ist für eine eindeutige Klassifizierung des relevanten Erregers und die Aufklärung der molekularepidemiologischen Situation unerlässlich. Da in der molekularen Charakterisierung ausschließlich PUUV-Sequenzen detektiert wurden, kann eindeutig gesagt werden, dass das Puumala-Virus für den Ausbruch im Jahr 2007 verantwortlich war.

4.3 Ursachen für spill over – Infektionen

Als Reservoirwirt für das Puumala-Virus in Deutschland gilt die Rötelmaus (*M. glareolus*). Auch in unserer Studie gehörte die Mehrzahl der latent mit Hantavirus infizierten Mäuse zur Gattung der Rötelmäuse, wodurch sie als Reservoirwirt bestätigt werden kann. Lediglich ein Transsudat einer Maus der Gattung *A. flavicollis* war sowohl im Enzymimmuntest (EIT) als auch im ImmunoBlot (IB) reaktiv. Dieses Ergebnis kann als spill over-Infektion angesehen werden, da *A. flavicollis* kein anerkannter Wirt für PUU-Viren in Deutschland ist. Wie es genau zu spill over-Infektionen kommt, kann noch nicht gesagt werden. Man geht davon aus, dass sich die Mäuse untereinander durch direkten Kontakt, wie zum Beispiel durch Bisse, infizieren. Auch durch die Aufnahme von Ausscheidungen anderer Mäuse als Aerosole könnten die Viren übertragen werden. Waldmäuse und

Rötmäuse teilen sich ihren Lebensraum in vielen Waldgebieten Deutschlands (Felten, 1952; Eichstätt, 1987), wodurch enge Kontakte zwischen den Tieren prinzipiell möglich wären. Die hohe Mäusedichte sowie die hohe Prävalenz von PUUV in der Rötelmauspopulation im Jahr 2007 könnte spill over-Infektionen begünstigt haben und für die beobachtete Infektion einer Maus der Gattung *A. flavicollis* mit PUUV verantwortlich gewesen sein. Leider sind die Ursache sowie die Konsequenzen von spill Over-Infektionen noch nicht genau erforscht, sie könnten jedoch eine große Rolle bei der Evolution der Hantaviren spielen.

4.4 Korreliert die Seroprävalenz von Hantaviren in Reservoirwirten mit der Zahl der humanen Hantavirus – Infektionen?

Von den sequenzierten, hantaviralen Nukleinsäuren wurden acht von Mäusen aus dem LK Aschaffenburg, drei von Mäusen aus dem LK Main-Spessart und eine von einer Maus aus dem StLK Aachen isoliert. Somit war die absolute Anzahl positiver Mäuse im LK Aschaffenburg am höchsten. Wenn man dies jedoch ins Verhältnis mit den Fangzahlen in den einzelnen Landkreisen setzt, war die Prävalenz unter den Rötmäusen (*M. glareolus*) im LK Main-Spessart mit 37,5% am höchsten, gefolgt von 28,6% im LK Aschaffenburg und 9,1% im StLK Aachen. In den Landkreisen Aschaffenburg und Main-Spessart war somit durchschnittlich jede dritte Maus latent mit PUUViren infiziert. Die Seroprävalenz in den Wirten korreliert gut mit den Inzidenzen (übermittelte Hantavirus-Fälle pro 100.000 Einwohner) in den verschiedenen Landkreisen im Jahr 2007, die ebenfalls im LK Main-Spessart mit 50,7 Personen pro 100.000 Einwohner am höchsten waren. Im LK Aschaffenburg waren 15,5 Personen pro 100.000 Einwohner an einer Hantavirusinfektion erkrankt, im SK Aachen 3,1 Personen und im LK Aachen 0,65 Personen pro 100.000 Einwohner. Die reellen Zahlen könnten allerdings auch sehr viel höher gelegen haben, da viele Hantavirusinfektionen aufgrund der grippeähnlichen Symptome von Ärzten übersehen werden. In jedem Fall wird in unserer Studie deutlich, dass in Regionen, in denen viele Mäuse latent mit Hantaviren infiziert sind, die Gefahr für humane Infektionen ebenfalls eindeutig steigt. Insofern wird auch in Zukunft die Untersuchung der Mäusepopulationen auf Hantavirusinfektionen wichtig sein, um die Risiken für die Bevölkerung abschätzen zu können.

4.5 Die untersuchten Sequenzen clustern deutlich als eigene Sublinien

4.5.1 Ähnlichkeiten zwischen Sequenzen aus geographisch benachbarten Fangorten

Der Serotyp PUUV besteht aus vielen, geographisch begrenzten Gruppen, die eine große Anzahl an phylogenetischen Linien, Untergruppen und Clustern bilden. Es sollte herausgefunden werden, welche Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den S-Segment-Nukleotid-Sequenzen der PUUV-RT-PCR-Produkte aus den untersuchten Landkreisen zu bereits bekannten Sequenzen bestehen. Dafür wurden die gewonnenen Nukleinsäuren sequenziert, phylogenetisch analysiert und anschließend mit bereits publizierten PUUV-S-Segment-Sequenzen aus Deutschland und anderen Regionen Europas verglichen. Die Frage war, ob ein neuer PUUV-Subtyp gefunden werden kann, der für die zunehmende Anzahl von Hantavirus-Erkrankungen im Jahr 2007 verantwortlich gewesen war.

Innerhalb verschiedener Sequenzen aus einer geographischen Region wurden nur geringe Unterschiede in den PUUV-S und M-Segmenten gefunden. So war beispielsweise der untersuchte Abschnitt des S-Segmentes von *Aachen172* zu 93% identisch mit einer untersuchten S-Segment-Sequenz aus Köln (*CologneMu05/272*), die M-Segmente waren zu 96% identisch. Dies steht in Übereinstimmung mit Publikationen von Essbauer et al. aus den Jahren 2006 und 2007, in denen ebenfalls geringe Sequenzunterschiede zwischen PUUV-Segmenten aus geographisch benachbarten Regionen beschrieben worden waren. Es scheint sich bei den Sequenzen aus Nordrhein-Westfalen um einen PUUV-Stamm zu handeln, der mit relativ geringer Diversität in den verschiedenen Populationen zirkuliert. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass zwischen den lokalen Rötelmaus-Populationen ein genetischer Austausch stattfindet und sie sich dadurch wenig divergent voneinander entwickeln. Auch die verschiedenen S-Segment-Sequenzen aus dem Spessart (z.B. *Laufach133*, *Laufach117* etc.) zeigten untereinander nur eine geringe Sequenzdiversität. Jedoch war keine große Ähnlichkeit zu Sequenzen aus geographisch benachbarten Regionen, wie zum Beispiel Bayern oder Heidelberg zu erkennen. Die Divergenz von *Laufach133* zu *BavariaCG9/04* und *Heidelberg/hu* betrug beispielsweise 9%. Auch die M-Segment-Sequenz *Laufach133* war zu *BavariaCGT157/05* und zu *Weissach31* zu 9% divergent. Eine Studie von Heiske et al. aus dem Jahr 1999 publizierte Sequenz-Unterschiede von mehr als 14% als eigene PUUV-Linie und Unterschiede von mehr als 8% als eigene Sublinie. Wenn man diese Ergebnisse betrachtet, so gehören die genannten Sequenzen aus Süddeutschland zwar zu einer PUUV-Linie, die von uns identifizierte Sequenz *Laufach133* clustert jedoch als eigene Sublinie, und unterscheidet sich deutlich von bisher in Deutschland publizierten Sequenzen.

4.5.2 Unterschiede von Hantavirus-Sequenzen zwischen verschiedenen Fangorten

In Deutschland und Umgebung kann von zwei getrennten genetischen PUUV-Linien gesprochen werden, die sich geographisch zuordnen lassen. Die eine Linie umfasst Sequenzen aus Süddeutschland (*Bayern, Renningen, Laufach* und *Rechtenbach*), zur anderen Gruppe gehören die Sequenzen aus West- und Nordwest-Deutschland sowie aus Belgien (*Momgnies, Thuin* etc.). Auch bei unseren Ergebnissen wiesen Virussequenzen aus Mäusen geographisch entfernter Regionen untereinander hohe Sequenzvariabilitäten auf. So zeigten die S-Segment-Sequenzen aus Aachen eine Divergenz von 15% zu Sequenzen aus Bayern und eine Divergenz von 17% zu Sequenzen aus Umea in Schweden (*Umea/hu*). Die Sequenz *Laufach133* war zu 16% divergent zu *Cologne Mu05/258* und sogar zu 18% divergent zur Sequenz *Umea/hu* aus Schweden. Die M-Segment-Sequenzen zeigten ähnlich große Unterschiede. Die Ergebnisse zeigen eine hohe Variabilität zwischen Sequenzen aus verschiedenen Regionen Deutschlands. In unserer Studie konnte bestätigt werden, dass Sequenzen aus Westdeutschland (*Aachen*) und Süddeutschland (*Laufach*) klar getrennt voneinander clustern und zwei getrennte PUUV-Linien bilden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es sich von Anfang an um unterschiedliche PUU-Virus-Stämme gehandelt hat, die in der Vergangenheit aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands und den Nachbarländern eingeschleppt wurden. Eine weitere Theorie ist, dass sich geographisch klar voneinander getrennte Hantavirus-Populationen different entwickelt haben. Die Verschiedenheit der einzelnen PUUV-Linien spricht für eine separate Evolution in den verschiedenen Regionen Deutschlands. Es ist bekannt, dass eine Akkumulation von Punktmutationen zu signifikanten Unterschieden in der genetischen Diversität zwischen Viren (genetischer Drift) führen kann. Außerdem können Genom-Reassortment-Prozesse schnell genetische Eigenschaften von Viren (genetischer Shift) verändern. Bereits bei verschiedenen RNA-Viren wurden genetische Shifts als wichtiger Faktor in der Evolution der Viren identifiziert. Beispiele hierfür sind das HI-Virus sowie Enteroviren und Dengue-Virus. Solche Prozesse sind für Hantaviren auch bereits *in vitro* und *in vivo* gezeigt worden (Klempa et al., 2003b). Insgesamt beweisen die Ergebnisse unserer Studie erneut eine hohe Variabilität zwischen den Puumalavirus-Populationen innerhalb Deutschlands. Gleichzeitig zeigt sich eine klare Clusterung der Virussequenzen, entsprechend ihrer geografischen Herkunft.

4.6 Ursachen für die massive Zunahme der Hantavirusinfektionen im Jahr 2007

4.6.1. Ursachen in der Nagetierpopulation

Hantaviren werden von Nagetieren über Speichel, Kot und Urin ausgeschieden. Der Mensch infiziert sich in der Regel durch die Inhalation erregerhaltigen Staubes, selten auch durch Nagetierbisse. Während die tierischen Reservoirwirte persistent und inapparent infiziert sind, führt die Infektion des „Fehlwirtes“ Mensch zur akuten Erkrankung. Viele Studien zeigten bereits die Korrelation von Hantavirus-Infektionen mit der Populationsdichte ihrer Reservoirwirten (Hjelle et al., 2000; Calisher et al., 2001). Ein Grund für den sprunghaften Anstieg von humanen Hantavirusinfektionen im Jahr 2007 könnte die hohe Mäusedichte gewesen sein. Diese war im Jahr 2007 sehr hoch, da durch den milden Winter 06/07 und die Buchenmast des Herbstes 2006 eine Massenvermehrung begünstigt worden war (RKI, 2007). Außerdem ermöglichte das warme Wetter im April eine frühe Wiederaufnahme der Reproduktionstätigkeit der Mäuse. Bereits in den Jahren 2002 und 2004 konnten in Baden-Württemberg, nach jeweils vorangegangenen milden Wintern, mit einem Überangebot an Nahrung für die Nagetierwirte, eine Häufung von klinisch apparenten humanen Hantavirusinfektionen beobachtet werden (Ulrich et al., 2004; Ulrich et al., 2004b). Die hohe Anzahl der Nagetiere geht mit einem Zuwachs der Erkrankungsfälle beim Menschen einher, da das Übertragungsrisiko natürlicherweise mit der Zunahme der Mäusedichte ansteigt. Auch steigt bei einer hohen Populationsdichte die Zahl der infizierten Nager und frisch infizierte Tiere sind besonders ansteckend (Davis et al., 2005). Die Dynamik der Entwicklung der Nagerpopulation und ihrer Durchseuchung hat also prinzipielle Auswirkungen auf das menschliche Infektionsrisiko.

4.6.2 Risikoverhalten bei den Menschen

Ein Grund für die saisonalen Gipfel von Mai bis Juli könnte sein, dass bei schönem Wetter durch einen häufigen Aufenthalt im Freien das Risiko für Menschen steigt, mit virushaltigen Ausscheidungen der Mäuse in Kontakt zu kommen. Auch steigt das Risiko einer Infektion je nach individueller Wahrscheinlichkeit des direkten Kontaktes mit infektiösen Ausscheidungen der Nager. Beispielsweise zeigten die Ergebnisse unserer Studie, dass fast alle erkrankten Personen in den Landkreisen Main-Spessart und Aschaffenburg weniger als 100 Meter von einer Wiese oder einem Acker entfernt wohnten, wodurch der Kontakt mit Mäusen sehr wahrscheinlich war. Auch gab eine Mehrzahl der befragten Personen an, in den letzten Wochen im Garten gearbeitet, Holz umgeschichtet oder den Keller ausgekehrt zu haben. All dies sind Tätigkeiten, bei denen Mäusekot aufgewirbelt werden kann und somit die Gefahr einer Infektion mit Hantaviren steigt. Bei einer

Studie an ca. 13.000 Seren von Bewohnern verschiedener geographischer Regionen Deutschlands wurde eine durchschnittliche Seroprävalenz von 1,7% gefunden (Zöller et al., 1995). Bei Personengruppen, die wegen ihres Berufes oder ihres Wohnortes in Endemiegebieten einer erhöhten Expositionsgefährdung ausgesetzt sind, wurden höhere Antikörperprävalenzen mit bis zu 10% gefunden (Zöller et al., 1995; Kimmig et al., 2001; Rieger et al., 2005). Insbesondere Beschäftigte in der Forst- und Landwirtschaft sowie im Bauwesen haben ein erhöhtes Infektionsrisiko, da sie sich häufig im Lebensraum von Rötelmäusen und anderen wild lebenden Nagetieren aufhalten (Muna Abu Sin, 2005). In den von uns untersuchten Landkreisen waren 86% der erkrankten Personen Männer. Auch Daten des Robert-Koch-Instituts (<http://www.3.rki.de/SurvStat>) aus den vergangenen Jahren zeigen, dass Männer prozentual deutlich häufiger an einer „*Nephropathia epidemica*“ in Deutschland erkranken als Frauen. Fast 70% der erkrankten Personen waren im Alter zwischen 30 und 60 Jahren, was mit aktuellen Daten von Mertens et al. übereinstimmt (Mertens et al., 2009). Gründe für die höhere Inzidenz unter Männern könnten unter anderem sein, dass mehr Männer in der Land- und Forstwirtschaft tätig sind als Frauen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Dynamik der Nagetierpopulation als auch das individuelle Verhalten mit hoher Wahrscheinlichkeit Auswirkungen auf das Risiko, an einer Hantavirusinfektion zu erkranken, haben.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Mit 1687 Fällen gehörten Hantavirus-Erkrankungen im Jahr 2007 zu den fünf häufigsten meldepflichtigen Viruserkrankungen in Deutschland. Die massive Erhöhung der Fallzahlen beruhte insbesondere auf Ausbrüchen von Puumalavirus-Infektionen im Süden und Westen Deutschlands. Persistent infizierte Nagetiere scheiden das Virus mit Urin, Kot und Speichel aus. Durch Inhalation dieser Exkrememente wird die Infektion auf den Menschen übertragen. Aus dem Übertragungsweg resultieren auch die Risikogruppen, wie zum Beispiel Waldarbeiter, Soldaten und Tierpfleger. Diese Personengruppen haben ein erhöhtes Infektionsrisiko, da sie sich häufig im Lebensraum von Rötelmäusen und anderen wild lebenden Nagetieren aufhalten. Während die tierischen Reservoirwirte persistent und inapparent infiziert sind, kann die Infektion des „Fehlwrirts“ Mensch zur akuten Erkrankung führen.

Die Hantaviruserkrankung in Deutschland wird als „*Nephropathia epidemica*“ bezeichnet und ist durch akut einsetzende Kopf- Rücken- und Abdominalschmerzen, Thrombozytopenie sowie Nierenfunktionsstörung und Fieber gekennzeichnet. Ein Teil der Patienten wird wegen des Nierenversagens zeitweise dialysepflichtig. Endemiegebiete für Hantavirus-Infektionen sind bereits seit vielen Jahren in Baden-Württemberg (Schwäbische Alb), Bayern (Unterfranken),

Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen bekannt (Pilaski et al., 1991; Zöller et al., 1995).

Um in Zukunft Ausbrüche verhindern zu können, ist es wichtig, in Endemiegebieten den Kontakt zu Mäusen und deren Ausscheidungen zu reduzieren oder völlig zu vermeiden. Eine mögliche Infektionsgefahr sollte in Abhängigkeit vom aktuellen Infektionsniveau berücksichtigt und notwendige Maßnahmen zum Infektionsschutz beachtet werden. Beispielsweise wird die Vermeidung von Staubentwicklung in kontaminierten Bereichen sowie das Tragen von Atemschutzmasken und Einweghandschuhen in Hochrisikogebieten empfohlen. Außerdem sollte in Zukunft eine Aufklärung der Bevölkerung über Infektionsrisiken und Schutzmaßnahmen erfolgen, um das Risikoverhalten zu verringern. Auch Ärzte müssen auf die steigenden Zahlen von Hantavirusinfektionen hingewiesen werden, um bei grippeähnlichen Symptomen eine mögliche Infektion mit Hantaviren differentialdiagnostisch zu berücksichtigen. Im Gegensatz zur gut dokumentierten Situation beim Menschen, ist die Kenntnis der geografischen Verbreitung und Häufigkeit von Hantavirus-Infektionen in den Nagetier-Reservoirs und deren Schwankungen noch zu gering. Im Rahmen unserer Studie konnten in drei stark betroffenen Landkreisen die Virusstämme der lokalen Rötelmaus-Reservoirs molekularphylogenetisch charakterisiert werden. Longitudinale Studien sind wichtig, um die Evolution der Pathogene weiterhin zu verfolgen und das Risiko für humane Infektionen besser abschätzen zu können. Hinsichtlich der zu erwartenden globalen Veränderungen des Klimas sollten diese Langzeitstudien zukünftig auch Aussagen zum Einfluss klimatischer Bedingungen auf Nagetier-Populationen und den mit ihnen assoziierten Krankheitserregern ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

- Abu Sin M, Stark K, van Treeck U, Diackmann H, Uphoff H, Hautmann W, Bornhofen B, Jensen E, Pfaff E, Koch J (2005) Risk factors for hantavirus infection in Germany. *EID Journal Home*, Volume 13, Number 9/07
- Antoniadis A, Stylianakis A, Papa A., Alexiou-Daniel S, Lampropoulllos A, Nichol ST, Peters CJ, Spiropoulou CF (1996) Direct genetic detection of Dobrava virus in Greek and Albanian patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 174:407-410.
- Antoniadis A, Pilaski J, Klein H (1985) Serologic evidence for Korean hemorrhagic fever in western Germany. *Zbi Bakt Hyg A*, 260:459.
- Arai S, Son JW, Sumibcay L, Bennett SN, Nerurkar VR, Parmenter C, Cook JA, Yates TL, Yanagihara R (2007) Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. *Emerg Infect.Dis.*;13:1420-1423
- Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stonjanovic R, Gligic A, van der Groen G, Leduc LW (1992) Characterization of Dobrava virus, a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol*, 38(2) S.132-37.
- Avsic-Zupac T, Toney A, Anderson K, Chu YK, Schmaljohn C (1995) Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *J Gen Virol* 76:2801-2808.
- Avsic-Zupanc T, Petrovec M, Furlan P, Kaps R, Elgh F, Lundkvist A (1999) Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia- a 10-year survey. *Clin Infect Dis*, 28: 860-865.
- Bowen MD, Gelbmann W, Ksiazek TG, Nichol ST, Nowotny N (1997) Puumala virus and two genetic variants of Tula virus are present in Austrian rodents. *Journal of Medical Virology*; 53:174-181.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 71(2): 492-8.
- Brummer-Korvenkontio M, Vahari A, von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blom N, Lachdvirta J (1980) Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 141: 131-134.
- Calisher CH, Mills JN, Sweeney WP, Choate JR, Sharp DE, Canestorp KM, Beaty BJ (2001) Do unusual site-specific population dynamics of rodent reservoirs provide clues to the natural history of hantaviruses? *Journal of Wildlife Diseases*. 37:280-288.
- Cameron JS (2001) The history of viral haemorrhagic fever with renal disease (hantavirus). *Nephrol Dial Transplant*, 16: 1289-1290.

- Carey DE, Reuben R, Panicker KN, Shope RE, Myers RM (1971) Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res*, 59:1758-1760.
- Casals J, Henderson BE, Hoogstraal H, Johnson KM, Shelokov A (1970) A review of Soviet viral hemorrhagic fevers. *J Infect Dis* 122:437-453.
- Chapman LE, Mertz GJ, Peters CJ, Jolson HM, Khan AS, Ksiazek TG, Koster FT, Baum KF, Rollin PE, Pavia AT, Holman RC, Christenson JC, Rubin PJ, Behrman RE, Bell LJ, Simpson GL, Sadek RF and the Ribavirin Study Group (1999) Intravenous ribavirin for hantavirus pulmonary syndrome: safety and tolerance during 1 year of open-label experience. *Antivir Ther* 4:211-219.
- Chapman LE, Ellis BA, Koster FT, Sotir M, Ksiazek TG, Mertz GJ, Rollin PE, Baum KF, Pavia AT, Christenson JC, Rubin PJ, Jolson HM, Behrman RE, Khan AS, Bell LJ, Simpson GL, Hawk J, Holman RC, Peters CJ and the Ribavirin Study Group (2002) Discriminators between hantavirus-infected and –uninfected persons enrolled in a trial of intravenous ribavirin for presumptive hantavirus pulmonary syndrome. *Clin Infect Dis* 34:293-304.
- Childs JE, Ksiazek TG, Spiropoulou CF, Krebs JW, Morzunov S, Maupin GO, Gage KL, Rollin PE, Sarisky J, Ensore RE, Frey JK, Peters CJ, Nichol ST (1994) Serologic and Genetic Identification of *Peromyscus maniculatus* as the Primary Rodent Reservoir for a New Hantavirus in the Southwestern United States. *J Infect Dis* 169:1271-1280.
- Cho HW, Howard CR, and Lee HW (2002) Review of an Inactivated Vaccine against Hantaviruses. *Intervirology* 45:328-333.
- Choi Y, Ahn CJ, Seong KM, Jung MY, Ahn BY (2003) Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine* 21:1867-1873.
- Clement J, Heymann P, McKenna P, Colson P, Avsic-Zupanc T (1997) The hantaviruses of Europe: from the bedside to the bench. *Emerg Infect Dis*, 3:205-211.
- Cosgiff TM (1991) Mechanisms of disease in hantavirus infection: pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Rev Infect Dis* 13 pp. 97-107.
- Dargeviciute A, Brus SK, Sasnauskas K, Krüger DH, Meisel H, Ulrich R, Lundkvist A (2002) Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. *Vaccine* 20:3523-3531.
- Davis S, Calvet E, Leirs H (2005) Review: Fluctuating Rodent Populations and Risk to Humans from Rodent-Borne Zoonoses, Vector-Borne and Zoonotic Diseases. Volume 5, Number 4.
- Dekonenko A, Yakimenko V, Ivanov A, Morozov V, Nikitin P, Khasanova S, Dzagurova T, Tkachenko E, Schmaljohn C (2003) Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and Western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infection, Genetics and Evolution* 2003; 3:245-257
- Duchin JS, Koster FT, Peters CJ, Simpson GL, Tempest B, Zaki SR, Ksiazek TG, Rollin PE, Nichol S, Umland ET (1994) Hantavirus pulmonary syndrome: A clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *New England J Med*, 330:949-55.

- Eichstätt W, Eichstätt H (1985) Fünfjährige Untersuchungen zur Immigration von Kleinsäugetern in ein Gehöft im Norder der DDR. *Säugetierkd. Inf.* 2:235-244.
- Enria DA, Briggiler AM, Pini N, Levis S (2001) Clinical Manifestations of New World Hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 256:117-34.
- Essbauer S, Schmidt J, Conraths FJ, Friedrich R, Koch J, Hautmann W, Pfeffer M, Wölfel R, Finke J, Dobler G, Ulrich R (2006) A new Puumala hantavirus subtype in rodents associated with an outbreak of Nephropathia epidemica in South-East Germany in 2004. *Epidemiol Infect* 134:1333-1344.
- Essbauer S, Schmidt-Chanasit J, Madeja EL, Wegener W, Friedrich R, Petraityte R, Sasnauskas K, Jakob J, Koch J, Dobler G, Conraths FJ, Pfeffer M, Pitra C, Ulrich R (2007) Nephropathia epidemica in metropolitan area, Germany. *Emerg Infect Dis*,13:1271-1273.
- Felten H (1952) Untersuchung zur Ökologie und Morphologie der Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und der Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) im Rhein-Main-Gebiet. *Bonner zoologische Beiträge* 3: 187-207.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* 41:95-98.
- Heiske A, Anheier B, Pilaski J, Volchkov VE, Feldmann H (1999) A new Clethrionomys-derived hantavirus from Germany: evidence for the distinct genetic sublineages of Puumala viruses in Western Europe. *Virus Research.* 61:101-112.
- Heyman P, Plysnina A, Berny P, Cochez C, Artois M, Zizi M, Pirnay JP, Plyusnin A (2004) Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23:711-717.
- Heyman P, Mele RV, Smajlovic L, Dobby A, Cochez C, Vandenvelde C (2009) Association between habitat and prevalence of hantavirus infections in bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* Apr;9(2):141-6.
- Hjelle B, Jenison SA, Goade DE, Green WB, Feddersen RM, Scott AA (1995) Hantaviruses: clinical, microbiologic, and epidemiologic aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 32:469-508.
- Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, Herring B, Quan S, Polito A, Pichuantes S, Yamada T, Morris C, Elgh F, Lee HW, Artsob H, Dinello R (1997) Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. *J Clin Microbiol* 35(3):600-608.
- Hjelle B, Jenison S, Torrez Martinez N, Yamada T, Nolte K, Zumwalt R, MacInnes K, Myers G (1994): A novel hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory disease in the southwestern United States: evolutionary relationships to known hantaviruses. *J Virol* 68(2):592-596.
- Hjelle B, Glass GE (2000) Outbreak of hantavirus infection in the four corners region of the United States in the wake of the 1997-1998 El Nino-southern oscillation. *J Infect Dis*, 181:1569-1573

- Hujakka H, Koistinen V, Kuronen I, Eerikäinen P, Parviainen M, Lundkvist A, Vaehri A, Vapalahti O, Närvänen A (2003) Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test. *J Virol Methods*, 108:117-122.
- Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY, Smith JI, Wu ZO, LeDuc JW, Zheng ZM, Meegan JM, Wang YN, et al (1991) Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 164:1119-1127.
- Ibrahim IN, Sudomo M, Morita C, Uemura S, Muramatsu Y, Ueno H, Kitamura T (1996) Seroepidemiological survey of wild rats for Seoul virus in Indonesia. *Jpn J Med Sci Biol.* 49:69-74.
- Iversson LB, da Rosa AP, Rosa MD, Lomar AV, Sasaki Mda G, LeDuc JW (1994) Human infection by Hantavirus in southern and southeastern Brazil. *Rev Assoc Med Bras*, 40: 85-92.
- Johnson KM (2001) Hantaviruses: history and overview. *Curr Top Microbiol Immunol.*; 256:1-14.
- Johnson AM, Bowen MD, Ksiarek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Nichol S. (1997) Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238:115-127.
- Kallio ER, Voutilainen L, Vapalahti O, Vaehri A, Henttonen H, Koskela E, Mappes T (2007) Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology* 88: 1911-1916.
- Kanerva M, Mustonen J, Vaehri A (1998) Pathogenesis of Puumala and other hantavirus infections. *Rev Med Virol*, 8:67-86.
- Khaiboullina SF, St. Jeor SC (2002) Hantavirus immunology. *Viral Immunol* 15:609-625.
- Kimmig P, Silve-Gonzalez R, Backe H, Brockmann S, Oeme R, Ernst E, Mackenstedt U (2001) Epidemiologie von Hantaviren in Baden-Württemberg. *Gesundheitswesen* 63:107-112.
- Klempa B (2004) Dobrava and Tula hantaviruses from central Europe: molecular evolution and pathogenic relevance. Doktorarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
- Klempa B, Schütt M, Auste B, Labuda M, Ulrich R, Meisel H, Krüger DH (2004) First molecular identification of human Dobrava virus infection in central Europe. *J Clin Microbiol.* 42:1322-1325.
- Klempa B, Schmidt HA, Ulrich R, Kaluz S, Labuda M, Meisel H, Hjelle B, Krüger DH (2003b) Genetic interaction between distinct Dobrava hantavirus subtypes in *Apodemus agrarius* and *A. flavicollis* in nature. *J. Virol.* 77:804-809.
- Klempa B, Meisel H, R ath S, Bartel J, Ulrich R, Krüger DH (2003) Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula hantavirus circulates. *J Clin Microbiol.* 41:4894-4897.

- Klempa B, Stanko M, Labuda M, Ulrich R, Meisel H, Krüger DH (2005) Central European Dobrava hantavirus isolate from a striped field mouse, *Apodemus agrarius*. *J Clin Microbiol.* 43, pp 2756-2763.
- Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Denys C, Koivogui L, ter Meulen J, Krüger DH (2006) Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis.*12(5):838-40.
- Klempa B, Fichet-Calvet W, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Barriere P, Koivogui L, ter Meulen J, Krüger DH (2007) Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis.*13 :520-522.
- Koch J. (2006) Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Hantaviruserkrankungen im Zeitraum 2001-2005. *Epidem. Bull.* 40:1-3.
- Koch J, Liang M, Queitsch I, Kraus AA, and Bautz EK (2003) Human recombinant neutralizing antibodies against hantaan virus G2 protein. *Virology* 308(1):64-73.
- Kolakofsky D (1991) *Bunyaviridae: Current Topics in Microbiology and Immunology* Band 169. Springer Verlag, New York.
- Kruger DH, Ulrich R, Lundkvist AA (2001) Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect*, 3:1129-1144.
- Lähdevirta J (1971) Nephropathia epidemica in Finland. A clinical histological and epidemiological study. *Ann Clin Res* 3:1 54.
- Lee HW, Baek LJ, Johnson KM (1982) Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis*, 146:638-644.
- Lee HW (1996) Epidemiology and pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *The Bunyaviridae*, ed. R.M. Elliot. New York: Plenum Press. 253-267.
- Lee HW, Johnson KM (1978) Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J.Infect Dis.* 137:298-308.
- Levis S, Rowe JE, Morzunov S, Enria DA, St Jeors (1997) New Hanta viruses causing hantavirus pulmonary syndrome in central argentina. *Lancet* 349:998-9.
- Liang M, Mahler M, Koch J, Ji Y, Li D, Schmaljohn C, and Bautz EK (2003) Generation of an HFRS patient-derived neutralizing recombinant antibody to Hantaan virus G1 protein and definition of the neutralizing domain. *J Med Virol* 69, 99-107.
- Linderholm M, Elgh F (2001) Clinical characteristics of hantavirus infections on the Eurasian continent. *Curr Top Microbiol Immunol.*; 256:135-51.
- Lundkvist A, Horling J, Niklasson B (1993) The humoral response to Puumala virus infection (nephropathia epidemica) investigated by viral protein specific immunoassays. *Arch Virol*, 130:121-130.

- Lundkvist A, Hukic M, Horling J, Gilljam M, Nichol S, Niklasson B (1997) Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. *J Med Virol* 53:51-59.
- Lundkvist A, Kalli-Kokko H, Sjolander KB, Landinen H, Niklasson B, Vaheri A, Vapalahti O (1996) Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity. *Virology* 216:397-406.
- Lundkvist A, Wiger D, Hörling J, Sjölander KB, Plyusnina A, Mehl R, Vaheri A, Plyusnin A. (1998) Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway. Evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *Journal of General Virology* 1998;79:2603-2614.
- Mackow ER, Gavrillovskaya IN (2001) Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 256:91-115.
- Maet P, Clement J, Gavrillovskaya I, Van Panst M (2004) Hantaviruses: Immunology, Treatment, and Prevention, *Viral Immunology* Volume 17, Number 3, 481-497.
- Markotic A, Nichol ST, Kuzman I, Sanchez AJ, Ksiazek TG, Gagro A, Rabatic S, Zgorelec R, Avsic-Zupanc T, Beus I, Dekaris D (2002) Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. *J Med Virol*, 66:542-551.
- Martinez VP, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Padula PJ (2005) Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis* 11:1848-1853.
- McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL, Kiley MP (1982) Morphological identification of the agent of Korean haemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the bunyaviridae. *Lancet* 1:765-768.
- Meisel H, Lundkvist A, Gantzer K, Bar W, Sibold C, Krüger DH (1998) First case of infection with hantavirus Dobrava in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(12):884-5.
- Mentel R, Bordihn N, Wegner U, Wendel H, Niklasson B (1999) Hantavirus Dobrava infection with pulmonary manifestation. *Med Microbiol Immunol*, 188:51-53.
- Mertens M, Schmidt-Chanasit J, Essbauer S, und Ulrich R (2006) Hantaviren: Entwicklung von serologischen Nachweisverfahren und Untersuchungen zu Verbreitung in Deutschland. *FLI Jahresbericht* 2006.
- Muranyi W, Bahr U, Zeier M, van der Woude F (2005) Hantavirus Infection. *J Am Soc Nephrol* 16, 3669-3679.
- Nemirov K, Vapalahti O, Lundkvist A, Vasilenko V, Gologvljova I, Plyusnina A (1999) Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *J Gen Virol* 80 pp. 371-379. View Record in Scopus.
- Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ (1993) Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262:914-917.

- Niklasson B, Hornfeldt B, Lundkvist A, Bjorsten S, Leduc J (1995) Temporal dynamics of Puumala virus antibody prevalence in voles and of nephropathia epidemica incidence in humans. *Am J Trop Med Hyg*, 53:134-140.
- Niklasson B, Jonsson M, Widegren I, Persson K, LeDuc J (1992) A study of nephropathia epidemica among military personnel in Sweden. *Res Virol*, 143:211-214.
- Page RDM. (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Appl In the Biol Sciences* 12:357-358.
- Papa A, Antoniadis A (2001) Hantavirus infections in Greece-an update. *Eur J Epidemiol*,17:189-194.
- Pei-Wen T, Li-Ching C, Cheng-Hua H (2005) Hanta hemorrhagic fever with renal syndrom: a case report and review. *J Microbiol Immunol Infect*, 38:221-223.
- Peters CJ, Simpson GL, Levy H (1999) Spectrum of Hantavirus Infection: Hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med*, 50:531-45.
- Pilaski J., Zoller L., Blenk H., Hämorrhagisches Fieber mit renalema Syndorm (HFRS): Eine durch Nagetiere übertragene Nephropathie des Menschen. *Wehrmed. Mschr* 1986:30:435-44.
- Pilaski J, Ellerich C, Kreutzer T, Benik W, Lewandowski B, Lang A., Autenrieth IB, Vanek E (1991) Endemisches Vorkommen des Hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom (HFRS) in der Bundesrepublik Deutschland. *Z ärztl. Fortbildung* 85:869-874.
- Pilaski J, Ellerich C, Kreutzer T, Lang A, Benik A (1991) Haemorrhagic fever with renal syndrome in Germany. *Lancet* 337:111.
- Plysnin A, Morzunov S (2001) Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top In Microbiol and Immunol*. 256:47-75.
- Plysnin A, Cheng Y, Vapalahti O, Pejcoch M, Unar J, Jelinkova Z, Lehväsliho H, Lundkvist A, Vaheri A, (1995) Genetic variation in Tula hantaviruses: sequence analysis of the S and M segments of strains from central Europe. *Virus Res* 39:237-250.
- Plysnin A, Kruger DH, Lundkvist A (2001b) Hantavirurs infections in Europe. *Adv Virus Res*, 57:105-136.
- Plysnin A, Vapalhati O, Vaheri A (1996) Hantaviruses: Genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol*, 77:2677-2687.
- Plysnin A, Vapalahti O, Vasilenko V, Henttonen H, Vaheri A (1997) Dobrava hantavirus in Estonia: does the virus exist throughout Europe? *Lancet* 349:1369-1370.
- Razanskiene A, Schmidt J, Geldmacher A, Ritzi A, Niedrig M, Lundkvist A, Kruger DH, Meisel H, Sasnauskas K, and Ulrich R (2004) High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 111(3):319-333.

- Reip A, Haring B, Sibold C, Stohwaser R, Bautz EK, Darai G, Meisel H, Krüger DH (1995) Coding strategy of the S and M genomic segments of a hantavirus representing a new subtype of the Puumala serotype. *Arch Virol* 140:2011-2026
- Rieger MA, Nübling M, Hofmann F (2005) Berufliche Gefährdung der Landwirte durch Hantaviren. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin Fb 1036.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2007) Massive Zunahme der Hantavirus-Infektionen in den ersten Monaten des Jahres 2007. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 24.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2008/1) Zahl der Hantavirus-Erkrankungen erreichte 2007 in Deutschland einen Höchststand. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 19.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2008/2) Epidemieartige Zunahme der Hantavirus-Erkrankungen in Deutschland im Jahr 2007. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 19.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003 Aug 12;19(12):1572-4.
- Sandmann S, Meisel H, Razanskiene A, Wolbert A, Pohl B, Krüger DH, Sasnauskas K, Ulrich R (2005) Detection of human hantavirus infections in Lithuania. *Infection*. 33:66-72.
- Schlegel M (2008) Untersuchungen zur Verbreitung von Hantaviren bei Nagetier Reservoirwirten in Deutschland. Diplomarbeit an der Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften.
- Schmaljohn C, Nichol S, Knipe DM, Howley PM, (2007) Bunyaviridae: History and Classification. *Fields Virology*, fifth edition:1745-1746.
- Schmaljohn C, Dalrymple JM (1983) Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of bunyaviridae. *Virology* 131:482-491.
- Schmaljohn C, Hjelle B (1997) Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infectious Dis*, 3:95-104.
- Schmaljohn CS, Jemmings GB, Hay J, Dalrymple JM (1986): Coding Strategy of the S- Genome Segment of Hantaan Virus. *Virology* 155:633-643.
- Schmaljohn CS, Hasty SE, and Dalrymple JM (1992) Preparation of candidate vaccinia-vectored vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome. *Vaccine* 10(1)10-13.
- Schmidt-Chanasit J, Meisel H, Hofmann J, Rang A, Lambrecht E, Ulrich R, Doerr HW (2008) Clinical course and laboratory parameters of the first Dobrava-Belgrade hantavirus infection imported to Germany. *Journal of Clinical Virology*. Volume 42, Issue1. May2008:91-93
- Schubert J, Tollmann F, Weissbrich B (2001) Evaluation of a pan-reactive hantavirus enzyme immunoassay and of a hantavirus immunoblot for the diagnosis of nephropathia epidemica. *J Clin Virol*. 21:63-74.
- Schubert U, Metzler B, Braun B (1991) Chronic renal dysfunction after Hantavirus infection. *Nephrol Dial Transplant* 14:1041.

- Schütt M, Gerke P, Meisel H, Ulrich R, Krüger DH (2001) Clinical characterization of Dobrava hantavirus infections in Germany. *Clin Nephrol.* 55:371-374.
- Schultze D, Lundkvist A, Blauenstein U, Heyman P (2003) Tula virus infection associated with fever and exanthema after a wild rodent bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21:304-306.
- Settergren B, Ahlm C, Juto P, Niklasson B (1991) Specific Puumala IgG virus half a century after hemorrhagic fever with renal syndrome. *Lancet*, 338:66.
- Sibold C, Ulrich R, Labuda M, Lundkvist A, Martens H, Schütt M, Gerke P, Leitmeyer K, Meisel H, Krüger DH (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.
- Sibold C, Meisel H, Lundkvist A, Schulz A, Cifire F, Ulrich R, Kozuch O, Labuda M, Krüger DH (1999) Short Report: Simultaneous occurrence of dobrava, puumala and tula hantaviruses in slovakia. *J Trop Med Hyg*, 61(3), pp 409-411.
- Sironen T, Plyusnina A, Andersen HK, Lodal J, Leirs H, Niemimaa J, Henttonen H, Vaheri A, Lundkvist A, Plyusnin A (2002) Distribution of Puumala hantavirus in Denmark. Analysis of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from Fyn and Jutland. *Vector-Borne and Zoonotic Disease*;2:37-45.
- Song JW, Gu SH, Bennett SN, Arai S, Puorger M, Hilbe M, Yanagihara R (2007) Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virol J* 4:114.
- Song JW, Baek LJ, Schmaljohn CS, Yanagihara R, (2007) Thottapalayam virus, a prototype shrewborne hantavirus. *Emerg Infect Dis.* 13:980-985.
- Svedmyr A, Lee PW, Goldgaber D, Yanagihara R, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Nystrom K (1982) Antigenic differences between European and East Asian strains of HFRS virus. *Scand J Infect Dis Suppl* 36:86-87.
- Tamura M (1964) Occurrence of epidemic hemorrhagic fever in Osaka City: first cases found in Japan with characteristic feature of marked proteinuria. *Biken J* 7:79-94.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Ulrich R, Meisel H, Schidt J, Kunz A, Klempa B, Niedrig M, Kimmig P, Pauli G, Krüger DH, Koch J (2004) Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 47: 661-670.
- Ulrich R, Hjelle B, Pitra C, Krüger DH (2002) Emerging viruses: the case „hantavirus“ *Intervirology* 45:318-327.
- Ulrich R (2007) Präsentation für das 24. Jenaer Symposium „Seltene Zoonosen in Deutschland“.

- Ulrich R, Lundkist A, Meisel H, Koletzki D, Bus K, Sjölander HR, Gelderblom HR, Borisova G, Schnitzler PI, Darai G, Krüger DH (1998) Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. *Vaccine* 16, 272-280.
- Ulrich R, Essbauer S, Schmidt J (2004) Untersuchungen zum gehäuftem Auftreten von klinisch apparenten humanen Hantavirusinfektionen in östlichen Landkreisen Niederbayerns im Sommer/Herbst. *FLI-Info: Labormitteilungen*.
- Ulrich R, Essbauer S, Schmidt J, Schütt M, Koch J, Conraths FJ, Pelze HJ, Wenk M (2006) Zunehmende Gefährdung durch von Nagetieren übertragene Hantaviren. „Der Wald“ 02/06, 90-94.
- Ulrich R, Meisel H, Schütt M, Schmidt J, Kunz A, Klempa B, Niedrig M, Pauli G, Krüger DH, Koch J (2004) Prevalence of hantavirus infections in Germany. *Bundesgesundheitsblatt* 47:661-670.
- Ulrich R, Schlegel M, Schmidt-Chanasit J, Jacob J, Freise J, Pelz H, Mertens M, Wenk M, Büchner T, Mausr D, Sevke K, Meier M, Thiel J, Triebenbacher C, Buschmann A, Lang J, Löhr P, Allgöwer R, Borkenhagen P, Schröder T, Endepols S, Heidecke T, Stodian I, Hueppop O, Hornung m, Fiedler W, Krüger F, Rühle F, Gerstengarbe W, Pfeffer M, Wegener W, Bemann M, Ohlmeyer L, Wolf R, Gehrke A, Heidecke D, Stubbe M, Zoller H, Koch J, Brockmann S, Heckel G, Essbauer S (2009) Hantaviren und Nagetiere in Deutschland: Das Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“
- Van der Werff ten Bosch J, Heyman P, Potters D, Peeters S, Cochez C, Pierard D (2004) Hantavirus Puumala infection as a cause of fever of unknown origin in a child, *Acta Paediatrica* 93:1120-1122.
- Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A (2003) Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 3:653-61.
- Wells RM, Sosa- Estani S, Yadon ZE, Enria D, Padula P, Pini N, Mills JN, Peter CJ, Segura EL (1997) An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg Infect Dis* 3(2):171-4.
- White JD, Shirey FG, French GR, Huggins JW, Brand OM, Lee HW (1982) Hantaan virus, aetiological agent of Korean haemorrhagic fever, has bunyaviridae-like morphology. *Lancet* 1:768-771.
- WHO: Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Bulletin of WHO*, 1983.61:269-275.
- Xiao SY, Leduc JW, Chu YK, Schmaljohn CS (1994) Phylogenetic analysis of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virology* 198:205-217.
- Xu Z, Wei L, Wang H, Jiang S (2002) The in vitro and in vivo protective activity of monoclonal antibodies directed against Hantaan virus: potential application for immunotherapy and passive immunization. *Biochem Biophys Res Commun.* 298,552-558.

- Zaki S, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS, Nolte KB, Foucar K, Feddersen RM, Zumwalt RE, Miller GL, Khan AS et al (1995) Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 146:552-579.
- Zeier M, Handermann M, Bahr U, Rensch B, Müller S, Kehm R, Muranyi W, Darai G, (2005) New Ecological Aspects of Hantavirus Infection: A Change of A Paradigm and a Challenge of Prevention – A Review. *Virus Genes* 30 (2):157-180.
- Zöller LG, Yang S, Gött P, Bautz EK, Darai G (1993) A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Clin Microbiol*, 31:1194- 1199.
- Zöller L, Yang S, Gött P, Bautz EKF, Darai G (1993) Use of recombinant nucleocapsid proteins of the Hantaan and Nephropathia Epidemica serotypes of hantaviruses as immunodiagnostic antigens. *J Med Virol* 39:200-207.
- Zöller L, Faulde M, Meisel H, Ruh B, Kimmig P, Schelling U, Zeier M, Kulzer P, Becker C, Roggendorf M et al. (1995) Seroprevalence of hantavirus antibodies in Germany as determined by a new recombinant enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 14:305-313.

6 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Hans W. Doerr und Herrn Dr. med. Jonas Schmidt-Chanasit für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich noch einmal Herrn Dr. med. Jonas Schmidt-Chanasit für seine große Hilfsbereitschaft. Danke für die geduldige Einweisung in die Laborarbeit und die exzellente Anleitung, die die Durchführung der Dissertation ermöglichten. Alle der im Rahmen dieser Arbeit benötigten Labor-Techniken konnte ich mir durch seine Hilfe aneignen. Ohne seine praktischen Anregungen und Hilfestellungen wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Weiterhin danke ich ihm für die ständige Bereitschaft zur Hilfe und Diskussion und die schnelle und exzellente Korrektur der vorliegenden Arbeit trotz der räumlichen Distanz. Danke.

Herrn PD Dr. Rainer Ulrich und Herrn Dipl. Biol. Marc Mertens möchte ich für die herzliche Gastfreundschaft zu Beginn meiner Arbeit am Friedrich-Löffler-Institut auf Riems sehr herzlich danken.

Ganz besonders danke ich meinem Vater für seine Hilfe beim Mäusefang im Landkreis Aachen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie. Die stete Hilfsbereitschaft aller Mitarbeiter und die gute Arbeitsatmosphäre habe ich sehr schätzen gelernt.

Nicht zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Freund und meinen Freunden für die Motivation und Unterstützung, die zur Vollendung dieser Arbeit notwendig waren.

Ich danke Vera und Susanne Sawatzki sowie meiner Mutter für die Korrektur dieser Arbeit.

7 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe – Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel “Nephropathia epidemica Ausbruch in Unterfranken und der Eifel: Molekularbiologische Untersuchungen zur verursachenden Hantavirusspezies im Sommer/Herbst 2007“ im Institut für Medizinische Virologie unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Hans W. Doerr und Herrn Dr. med. Jonas Schmidt-Chanasit ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in – oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, den 18.10.2009

Curriculum Vitae Stefanie Mikolajczak

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Stefanie Eva Therese Mikolajczak
Geboren am: 29.12.1983
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG UND STUDIUM

10/2003-11/2009: **J. W. Goethe Universität, Frankfurt am Main, Studium der Humanmedizin**
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note gut (2,0)
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note gut (2,0)
Gesamtnote: gut (2,0)

03/2007-12/2009 **Virologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main**
Experimentelle Promotionsarbeit mit dem Titel:
„Nephropathia epidemica - Ausbruch in Unterfranken und der Eifel: Molekularbiologische Untersuchungen zur verursachenden Hantavirusspezies im Sommer/Herbst 2007“
- Eingereicht im November 2009

2006-2008: **Physiologie der Universitätsklinik Frankfurt am Main**
Hilfsassistentin mit selbstständiger Lehrtätigkeit

08/2006-03/2007: **Universidade de Coimbra, Portugal**
Stipendiatin des Erasmus-Socrates-Programms

09/1994-06/2003: **Bischöfliches Pius-Gymnasium Aachen**
Abitur, Note: 1,3

08/2002-12/2002 **Delta Secondary School Vancouver, Kanada**
Schulaustausch in das englischsprachige Kanada

08/1990-07/1994: **Katholische Grundschule Höfchensweg in Aachen**

PRAKTIKA UND FAMULATUREN

10/2008-07/2009: **Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**
Praktisches Jahr mit Wahlfach HNO

12/2008-03/2009 **Kantonsspital Schwyz, Schweiz**
Viermonatiges Auslandstertial in der Inneren Medizin im Rahmen des Praktischen Jahres

<i>08/2008-10/2008</i>	Amrita Medical School, Kochin, Indien Zweimonatiges Auslandstertial in der Chirurgie im Rahmen des Praktischen Jahres
<i>02/2008-03/2008</i>	Komfo Anokye Teaching Hospital Kumasi, Ghana Stipendiatin des bvmd - Austauschprogrammes: Einmonatige Famulatur in der Kinderheilkunde
<i>09/2007-10/2007</i>	Charité Berlin, Hals- Nasen- Ohrenklinik Campus Benjamin Franklin Einmonatige Famulatur in der HNO
<i>07/2007:</i>	Friedrich Löffler Institut Riems Laborpraktikum zwecks Aneignung von Labortechniken wie Proteinaufreinigung sowie serologischer Methoden im Rahmen der Promotion
<i>08/2006-09/2006:</i>	Kinderarztpraxis Dr. Götz/Dr. Boosfeld in Aachen Einmonatige Famulatur in der Kinderheilkunde
<i>03/2006-04/2006</i>	Marienhospital Aachen Einmonatige Famulatur in der Inneren Medizin

INTERESSEN

<i>2006-2008:</i>	Bundesvertretung der Medizinstudierenden Deutschland Mitorganisatorin des internationalen Famulantenaustausches mit Teilnahme am Bundeskongress der Medizinstudierenden
<i>Seit 2003:</i>	Katholische Gemeinde St. Michael in Aachen Leiterin und ehrenamtliche Ski- und Snowboard- Lehrerin einer Jugendfahrt
<i>1996-2003:</i>	Tennisverband Mittelrhein Mannschaftsführerin und Spielerin in einer Juniorinnen/ Damenmannschaft in der Oberliga (Erfolge: Oberligameister 1999 /2000)
Hobbies:	Tennis, Leichtathletik, Volleyball, Ski-/Snowboardfahren, Musik (langjähriges Klavierspiel), Schauspiel, Reisen

SPRACHKENNTNISSE

<i>Englisch:</i>	fließend	(Kanadaaufenthalt)
<i>Portugiesisch:</i>	fließend	(Portugalaufenthalt)
<i>Französisch:</i>	gut	
<i>Latein:</i>	großes Latinum	