

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Hantaviruserkrankungen des Menschen	4
2.1.1	Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom	5
2.1.2	Hantavirus-induziertes Kardiopulmonales Syndrom	7
2.1.3	Pathogenese und Diagnostik beim Menschen und im Nagetier	8
2.2	Hantavirusinfektionen bei Tieren	13
2.2.1	Hantaviren im natürlichen Reservoir	13
2.2.2	Wirtsspezifität von Hantaviren	15
2.2.3	Übersprünge („Spillover“) von Hantaviren	18
2.3	Hantavirusinfektionen in Deutschland	20
2.4	Zielstellung	24
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Nagetiere	25
3.2	Versuchsplanung	28
3.3	Pathologisch-anatomische Untersuchungen	30
3.4	Molekulare Speziesbestimmung	32
3.4.1	Probenmaterial	32
3.4.2	DNA-Isolierung	32
3.4.3	Cytochrom b–spezifische Polymerase Kettenreaktion (cyt b–PCR)	32
3.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.4.5	Sequenzierung mittels Didesoxy-Strangabbruchmethode nach Sanger	33
3.4.6	Auswertung	33
3.4.7	Phylogenetische Analyse	34
3.5	PUUV S-Segment Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von PUUV-RNA	35
3.5.1	Probenmaterial	35
3.5.2	Kontrollen	35
3.5.3	RNA-Isolierung	35
3.5.4	Durchführung der RT-PCR	35
3.5.5	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.5.6	Sequenzierung mittels Didesoxy-Strangabbruchmethode nach Sanger	36
3.5.7	Auswertung	36
3.5.8	Phylogenetische Analysen	36
3.6	Indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von anti-PUUV N-spezifischen Immunglobulinen der Klasse G (IgG)	37
3.6.1	Probenmaterial	37
3.6.2	Antigen und Kontrollen	37
3.6.3	Durchführung	37
3.6.4	Auswertung	39
3.7	Histopathologische Untersuchung	39

3.7.1	Probenmaterial	39
3.7.2	Kontrolle	39
3.7.3	Durchführung	39
3.7.3.1	Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung.....	40
3.7.4	Auswertung	40
3.8	Immunhistologische Untersuchung zum Nachweis des PUUV N-Proteins.....	40
3.8.1	Proben- und Kontrollmaterial.....	40
3.8.2	Schweineseren.....	41
3.8.3	Durchführung	41
3.8.4	Auswertung	42
3.9	PUUV S-Segment Reverse Transkription-semiquantitative Polymerase Kettenreaktionen (RT-sqPCR) zum organspezifischen Nachweis von PUUV-RNA.....	42
3.9.1	PUUV S RT-sqPCR 1	43
3.9.1.1	Probenmaterial.....	43
3.9.1.2	Kontrollen.....	45
3.9.1.3	Primer und Sonden	45
3.9.1.4	Durchführung	45
3.9.1.5	Auswertung	46
3.9.2	PUUV S RT-sqPCR 2	46
3.9.2.1	Probenmaterial.....	46
3.9.2.2	Kontrollen.....	48
3.9.2.3	Primer und Sonden	48
3.9.2.4	Durchführung	48
3.9.2.5	Auswertung	49
3.10	RNAscope® zum Nachweis von Positivstrang-RNA.....	49
3.10.1	Probenmaterial	49
3.10.2	Kontrollen	50
3.10.3	Sonden	50
3.10.4	Durchführung	50
3.10.5	Auswertung	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Rötelmäuse	52
4.1.1	Speziesbestimmung	52
4.1.2	Ergebnisse der RT-PCR und des indirekten anti-PUUV-IgG-ELISA und phylogenetische Zuordnung der PUUV-Sequenzen.....	52
4.1.3	Gewebeverteilung viraler RNA mittels RT-sqPCR.....	56
4.1.4	Gewebe- und Zellverteilung des PUUV N-Proteins.....	57
4.1.5	Gewebe- und Zellverteilung von Positivstrang-RNA	65
4.1.6	Pathologisch-anatomische Befunde	74
4.1.7	Histopathologische Befunde	74
4.1.8	Organspezifischer Nachweis von PUUV-RNA und N-Protein	79
4.1.9	Organspezifischer Nachweis von PUUV-RNA mittels RT-sqPCR, N-Protein mittels IHC und Positivstrang-RNA mittels ISH	81
4.1.10	Zusammenhang zwischen PUUV-Infektion und Koinfektion	83

4.2 Apodemus-Arten.....	84
4.2.1 Speziesbestimmung.....	84
4.2.2 Ergebnisse der RT-PCR und des indirekten anti-IgG-ELISA.....	84
4.2.3 Gewebeverteilung viraler RNA mittels RT-sqPCR.....	87
4.2.4 Gewebe- und Zellverteilung des PUUV N-Proteins mittels IHC.....	87
4.2.5 Pathologisch-anatomische Befunde	87
4.2.6 Histopathologische Befunde	87
5 DISKUSSION	90
5.1 PUUV-Infektionen in Rötelmäusen, Wald- und Gelbhalsmäusen des LK OS	90
5.2 Gewebeverteilung des PUUV im Rötelmausreservoir	93
5.3 Konsequenzen der PUUV-Infektion.....	95
5.3.1 Diskrepanzen zwischen dem Nachweis viraler RNA, N-Protein und Positivstrang-RNA	98
5.3.2 Bedeutung des Organ- und Zelltropismus für den Infektionsverlauf	100
5.4 Histopathologische Befunde.....	103
5.5 Rolle von Koinfektionen im Reservoir	105
5.6 Ausblick	107
6 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	109
6.1 Zusammenfassung	109
6.2 Summary	112
7 LITERATURVERZEICHNIS	114
8 ANHANG	136
8.1 Lösungen und Puffer	136
8.1.1 Sektion	136
8.1.2 Molekulare Speziesbestimmung.....	136
8.1.3 PUUV S RT-PCR.....	136
8.1.4 Indirekter anti-PUUV N-IgG-ELISA	137
8.1.5 H&E-Färbung.....	137
8.1.6 Immunhistologie	138
8.1.7 PUUV S RT-sqPCR 1	140
8.1.8 PUUV S RT-sqPCR 2	140
8.1.9 RNAscope®	140
8.2 Bezugsquellen.....	141
8.2.1 Antikörper, Einmalwaren, Kits und Reagenzien	141
8.2.2 Geräte und Software	145
8.3 Tabellen	147
8.3.1 Histopathologische Befunde	147
8.3.2 Immunhistologische Befunde	153
8.3.3 Zusammenhang zwischen PUUV-Infektion und Koinfektion.....	158
8.3.4 Zusammenhang zwischen Nachweis des PUUV N-Proteins und der PUUV-Positivstrang-RNA.....	159
8.3.5 Tabelle zur molekularen Speziesbestimmung	161
8.3.6 Tabelle zur phylogenetischen Zuordnung der PUUV-Sequenzen.....	162
8.3.7 Ct-Werte der RT-sqPCR	164

8.3.8	Organspezifischer Nachweis von PUUV-RNA und PUUV N-Proteins.....	165
8.3.9	Organspezifischer Nachweis von PUUV-RNA, PUUV N-Protein und PUUV-Positivstrang- RNA.....	168
8.3.10	Rohdaten-Tabellen.....	169
8.4	Abkürzungsverzeichnis	182