



Claudia Lütke-Besselmann-Growe (Autor)
Epidemiologische Untersuchung zur Seroprävalenz von nicht-primaten Hepacivirus-Infektionen bei Vollblütern

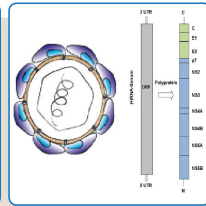
**Wissenschaftliche Reihe
der Klinik für Pferde**

Herausgegeben von
Karsten Feige, Peter Stadler,
Harald Sieme, Bernhard Ohnesorge



Claudia Lütke-Besselmann-Growe

**Epidemiologische Untersuchung zur Seroprävalenz
von nicht-primaten Hepacivirus-Infektionen
bei Vollblütern**



STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

20

 Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7252>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



1 Einleitung

Virusinfektionen verursachen häufig medizinisch und wirtschaftlich bedeutungsvolle Erkrankungen beim Pferd (BARTON 2010). Dazu zählen vor allem Infektionen mit Influenzaviren (MORLEY et al. 2000) und Herpesviren (PATEL u. HELDENS 2005). In den vergangenen fünf Jahren wurden neue Hepaciviren (KAPOOR et al. 2011; BURBELO et al. 2012; DREXLER et al. 2013; QUAN et al. 2013; BAECHLEIN et al. 2015) und Pegiviren (CHANDRIANI et al. 2013) in der Familie *Flaviviridae* entdeckt. Ein neuer Vertreter aus dem Genus Hepacivirus ist das nicht-primate Hepacivirus (NPHV), das zunächst bei Hunden (KAPOOR et al. 2011) und anschließend bei Pferden (BURBELO et al. 2012) gefunden wurde. Erste Untersuchungen zeigten, dass das Pferd der natürliche Wirt des nicht-primaten Hepacivirus (NPHV) ist und dass das Virus phylogenetisch mit dem Hepatitis C Virus (HCV) des Menschen sehr eng verwandt ist (BURBELO et al. 2012). Beim Menschen kann eine HCV-Infektion akute oder chronische Leberschäden verursachen (HOOFNAGLE 1997). Obwohl auch für das NPHV ein Lebertropismus nachgewiesen wurde, verläuft die Infektion bei Pferden meist klinisch inapparent (PFAENDER et al. 2015). In Serumproben von Vollblutpferden wurden im Vergleich zu anderen Rassen häufiger virale NPHV RNA und anti-NPHV NS3 (Nichtstrukturprotein 3) Antikörper nachgewiesen (PFAENDER et al. 2015). Die Ursache für die höhere Prävalenz von NPHV-Infektionen bei Vollblutpferden sowie natürliche Übertragungswege einer NPHV-Infektion sind bisher unbekannt und Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

Im Rahmen einer Querschnittstudie wurden daher zunächst die Prävalenzen von anti-NPHV NS3 Antikörpern und von viraler NPHV RNA in Serumproben von Vollblutpferden aus Nord- und Westdeutschland bestimmt. Anschließend wurden potentielle Risikofaktoren ermittelt, die einen Einfluss auf das Vorkommen von NPHV-Infektionen besitzen, um damit Informationen zum Übertragungsweg des Virus zu erhalten. Eine Einschätzung zur klinischen Relevanz sollte anhand von hämatologischen Untersuchungen und über die Bestimmung von blutchemischen Parametern in den Serumproben erfolgen.



2 Literaturübersicht

2.1 Das Hepatitis C Virus (HCV)

Das Hepatitis C Virus (HCV) verursacht beim Menschen akute oder chronische Lebererkrankungen. Neben den akuten Infektionen, die meist subklinisch verlaufen und kaum Komplikationen mit sich bringen, sind es vor allem die chronischen Infektionen, die mit lebensbedrohlichen Organschäden einhergehen können. Weltweit infizieren sich 3 - 4 Millionen Menschen pro Jahr neu, ca. 170 Millionen Menschen sind chronisch infiziert (MOHD HANAFIAH et al. 2013) und nahezu 350.000 Menschen sterben jährlich an den Folgen einer Hepatitis C Infektion, die zu Leberzirrhose oder Leberkarzinomen führen kann (DAVILA et al. 2004; PERZ et al. 2006). Die vorhandenen Medikamente sind insbesondere für Menschen aus Entwicklungsländern schwer zugänglich und sehr teuer (NEGRO 2014). Zusätzlich existiert derzeit kein prophylaktischer bzw. therapeutischer Impfstoff (BILLERBECK et al. 2013), weil für dessen Entwicklung ein geeignetes Tiermodell fehlt (BUKH 2012).

2.1.1 Vorkommen und Genotypen des HCV

Das Hepatitis C Virus, früher Nicht-A / Nicht-B Hepatitis-Virus, wurde bereits in den 1960er Jahren gefunden (FEINSTONE et al. 1975). Erst 1989 gelang es CHOO et al. das Genom zu klonieren. Experimentelle Infektionsversuche zeigten, dass neben den Menschen auch Schimpansen mit dem Virus infiziert werden können und erkranken (TABOR et al. 1978; KOLYKHALOV et al. 1997). Der Ursprung des Virus ist jedoch weiterhin unbekannt (SIMMONDS 2013).

Das Vorkommen unterschiedlicher Nukleotid Sequenzen (29 – 34 %) des HCV führte zu einer Gliederung des HCV in Genotypen (LINDENBACH et al. 2013). Die Genotypen werden wiederum in Subtypen eingeteilt (SMITH et al. 2014), die sich aus verschiedenen Isolaten zusammensetzen. Bei Unterschieden von 1 - 5 % der Nukleo-



tidsequenzen bezogen auf Virusgenome aus ein und demselben Tier, liegen Quasispezies vor (HOOFNAGLE 2002).

Obwohl das Hepatitis C Virus weltweit endemisch zu finden ist, wurde eine höhere Prävalenz für Afrika und Asien im Vergleich zu Nord-Amerika, West-Europa und Australien beschrieben (SHEPARD et al. 2005). Derzeit sind etwa 19 Millionen Menschen in Europa mit dem Virus infiziert (NEGRO 2014).

Die 7 Genotypen des Hepatitis C Virus weisen geographisch unterschiedlich hohe Prävalenzen auf (SIMMONDS 2004). In Nord-Amerika und Europa kommen am häufigsten die Genotypen 1a und 1b vor (WASLEY u. ALTER 2000). Eine auffallend hohe Prävalenz der Genotypen 1a und 3a tritt bei Drogenkonsumenten auf (PYBUS et al. 2005). In Asien findet häufig eine Infektion mit dem HCV Genotyp 1b und in China mit dem Genotyp 6 statt. Der Genotyp 4 kommt vor allem im mittleren Osten und Norden Afrikas vor. Die Genotypen 5 und 7 treten fast nur in Afrika auf (SIMMONDS 2004). Die genetisch größten Abweichungen bestehen zwischen dem Genotyp 4 aus Afrika und dem Genotyp 6 aus Südostasien und sind vermutlich vor 350 - 700 Jahren entstanden (PYBUS et al. 2001). Im Vergleich dazu scheint das HCV in westlichen Ländern erst vor etwa 100 Jahren aufgetreten zu sein (GRAY et al. 2011), sodass eine Ausbreitung aus Afrika bzw. Südostasien in die westlichen Länder vermutet werden kann. Die spätere Teilung und Verbreitung des Genotyps 1 in die Subtypen a und b fand vor etwa 60 - 70 Jahren statt (SIMMONDS et al. 2005) und könnte im Zusammenhang mit dem zweiten Weltkrieg und der damals vorherrschenden mangelhaften medizinischen Versorgung sowie dem Einsatz von Bluttransfusionen stehen (SIMMONDS 2013).

2.1.2 Taxonomie und Struktur des HCV

Das Hepatitis C Virus gehört zum Genus *Hepacivirus* und bildet zusammen mit den Pegiviren, den Pestiviren und den Flaviviren die Familie der *Flaviviridae* (SIMMONDS 2013).

Das HCV ist ein behülltes Virus mit einer positiven Einzelstrang-RNA und einer Länge von 9,6 Kilobasen (VON HAHN et al. 2010). Die RNA setzt sich zusammen aus dem offenen Leserahmen (*open reading frame* = ORF) und den beiden angrenzen-



den untranslationierten Bereichen (*untranslated region* = 5'UTR und 3'UTR) am 5' und 3' Ende (LINDENBACH et al. 2013). In der 5'UTR liegt die Bindungsstelle für das Ribosom an die RNA [*internal ribosome entry site* (IRES)] und zwei micro RNA (miR)-122 Bindungsstellen, die essentiell für die Replikation in der Leber sind (WILSON u. SAGAN 2014). Die Nukleotide des offenen Leserahmens kodieren für ein Polyprotein aus 3011 Aminosäuren. Das Polyprotein wird nach der Translation in der Wirtszelle mittels zellulärer und viraler Proteasen in 10 virale Proteine gespalten (LINDENBACH et al. 2013). Am N-terminalen Ende der ORF befinden sich die Gene, die vor allem für die Strukturproteine kodieren, zu denen das core-Gen, das E1-Gen und das E2-Gen gehören. Über die Vervielfachung des core-Gens entstehen Proteine für die Nukleokapsidkapsel und über die Gene E1 und E2 werden Oberflächenstrukturproteine exprimiert, die für den Eintritt in die Wirtszelle benötigt werden. Gleichzeitig bieten diese Oberflächenstrukturproteine Angriffsflächen für spezifische Antikörper des Wirtsorganismus. Zwischen den Struktur- und den Nicht-Strukturproteinen befindet sich das p7-Gen. Dieses Protein ist wichtig für den Zusammenbau und die Freisetzung von Viruspartikeln, ist jedoch nicht notwendig für die Virusreplikation. Zum C-terminalen Ende der ORF schließen sich die Gene: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B an. Diese Gene kodieren vor allem für Nicht-Strukturproteine, die für die Replikation innerhalb der Wirtszelle verantwortlich sind und für Strukturproteine, die für den Zusammenbau (*Assembly*) und die Freisetzung (*Release*) des Virus aus der Zelle benötigt werden (VON HAHN et al. 2010). Von besonderer Bedeutung ist das Gensegment NS5B, das für die RNA abhängige RNA-Polymerase kodiert. Die Polymerase ist sehr fehleranfällig, weil ein Korrektur-Lesesystem fehlt (BARTENSCHLAGER u. LOHMANN 2000). Zusätzlich ist die Replikationsrate des Virus mit einer Produktion von 10^{10} bis 10^{12} Virionen pro Tag (NEUMANN et al. 1998) sehr hoch. Dadurch entsteht eine große Genvielfalt und innerhalb eines infizierten Wirtes können genetisch eng verwandte, aber verschiedene Variationen des Virus, Quasispezies, auftreten (HOOFNAGLE 2002). Zusammenfassend sind die Strukturproteine vor allem wichtig für die extrazelluläre Existenz als Virion, den Zelleintritt und die Immunevasion und die Nicht-Strukturproteine vor allem



für die virale Replikation und dem Virus-Zusammenbau, der an die Lipoprotein Biogenese gekoppelt ist (BARTENSCHLAGER et al. 2011).

2.1.3 *In vitro* Modelle und *in vivo* Modelle

Der Replikationszyklus des Hepatitis C Virus beginnt mit dem Kontakt des Virus mit der Wirtsmembran (*Attachment*). Der anschließende Zelleintritt verläuft über eine rezeptorvermittelte Endozytose mit Verschmelzen der Virusmembran und der Wirtsmembran. Im Zytoplasma wird die virale RNA freigesetzt (*uncoating*). Die darauffolgende Translation findet am endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle statt. Nach der Translation entsteht ein Replikationskomplex, der durch die Nichtstrukturproteine NS3-NS5B gebildet wird (*membranous web*). Im letzten Schritt werden die neugebildeten Viruspartikel aus der Wirtszelle freigesetzt (*Assembly*).

In den vergangenen Jahren konnte über die Entwicklung und Nutzung von Replikonsystemen (LOHMANN et al. 1999), HCV-Pseudopartikeln (HCVpp) (BARTOSCH et al. 2003) und Zellkultur-abgeleiteten HCV-Partikeln (*cellculture-derived HCV particles* = HCVcc) (LINDENBACH et al. 2005) der gesamte Lebenszyklus des HCV *in vitro* untersucht werden. Ein immunkompetentes, geeignetes Tiermodell zur Entwicklung von prophylaktischen bzw. therapeutischen Impfstoffen fehlt jedoch (BILLERBECK et al. 2013).

2.1.3.1 *In vitro* Modelle

Die ersten Versuche, das Hepatitis C Virus anzuzüchten, um Informationen über den Lebenszyklus zu erhalten, begannen 1989 und blieben lange erfolglos (STEINMANN u. PIETSCHMANN 2013). Erst 1999 konnten erste Informationen zum Replikationsmechanismus des HCV über die Entwicklung von Replikonsystemen gewonnen werden (LOHMANN et al. 1999). Durch die Synthese einzelner Genabschnitte aus dem HCV Genom (insbesondere der Gene NS3 bis NS5B) an Reportergene kann eine HCV Replikon-RNA erstellt werden. Diese kann in menschlichen Leberzelllinien (*human hepatoma cells*, HuH7) repliziert werden und damit Aufschlüsse über den Repli-



kationsmechanismus des HCV geben. Einen weiteren Fortschritt brachte die Entwicklung sogenannter HCV Pseudopartikel (HCVpp), mit denen die Eintrittsschritte des Virus in die Zielzelle untersucht werden konnten (BARTOSCH et al. 2003). Dabei exprimieren Retroviren an ihrer Oberfläche die HCV Oberflächenproteine E1 und E2. Diese werden nach *in vitro* Transfektion von drei Plasmiden gewonnen. In das erste Plasmid ist ein retrovirales Gen, welches ein Reporter-gen beinhaltet, eingebaut. In das zweite Plasmid werden die retroviralen gruppenspezifischen Antigene *gag* und *pol* und in das dritte die HCV Gene E1 und E2 integriert. Die *gag* kodiert unter anderem für die Kapsidproteine und die *pol* für die Reverse Transkriptase.

Schließlich gelang es 2005 mit der Entdeckung des HCV-Isolates der *Japanese fulminant hepatitis 1* (JFH1) vom Genotyp 2a, Zellkultur-abgeleitete HCV-Partikel (HCVcc) *in vitro* zu gewinnen mit denen der gesamte Lebenszyklus vom Viruseintritt bis zur Freisetzung neuer infektiöser Viren untersucht werden konnte (LINDENBACH et al. 2005). Durch die Bildung von JFH-Chimären war es letztlich auch möglich alle anderen Genotypen und ihre Lebenszyklen zu untersuchen (STEINMANN u. PIETSCHMANN 2013).

2.1.3.2 *In vivo* Modelle

Trotz der Fortschritte im Bereich der Entwicklung von *in vitro* Modellen gibt es derzeit außer Schimpansen kein immunkompetentes, geeignetes Tiermodell für das Hepatitis C Virus (BILLERBECK et al. 2013).

Die Forschung an Schimpansen lieferte wertvolle Informationen über den Krankheitsverlauf, die Reaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems auf eine Infektion und die Wirksamkeit neuer Medikamente oder Impfstoffe. Obwohl bei Schimpansen seltener schwerwiegende Lebererkrankungen mit Fibrosen, Zirrhosen oder Karzinomen auftreten, sollte der Einsatz von Menschenaffen im Tierversuch aus ethischen Gründen stets kritisch hinterfragt werden (BILLERBECK et al. 2013).

Des Weiteren entdeckten Forscher, dass nördlichen Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) für das Hepatitis C Virus empfänglich sind (AMAKO et al. 2010). Experimentell infizierte Spitzhörnchen zeigten klinische Symptome einer milden Hepatitis und einer intermittierenden Virämie. Mittels histologischer Untersuchungen konnten zusätzlich



Leberveränderungen, wie Verfettung, Fibrosen und Zirrhosen bestätigt werden (AMAKO et al. 2010). Weitere Studien werden zeigen, inwiefern die Tiere für die HCV-Forschung eingesetzt werden können (BILLERBECK et al. 2013).

Derzeit wird vor allem an genmanipulierten, partiell-immunkompetenten Mäusen geforscht, die mit dem HCV infiziert werden können (BUKH 2012; VERCAUTEREN et al. 2015). Genmanipuliert, partiell-immunkompetent bedeutet, dass die Mäuse eine chimäre Leber aus Maus- und Menschen-Hepatozyten ausbilden und menschliche CD34⁺ haematopoetische Stammzellen aufweisen. Dieses System bietet eine gute Möglichkeit Informationen über den Lebenszyklus, die Pathogenese und erste Wirkungen von Medikamenten zu erhalten. Nachteilig ist, dass die Mäuse nicht gezüchtet werden können und das es sich nur um ein partiell-immunkompetentes Tiermodell handelt. Das heißt, dass immunologische Vorgänge und Wirkungen von Impfstoffen in diesem Modell nicht untersucht werden können (BILLERBECK et al. 2013).

2.1.4 Übertragungswege des HCV

Das Hepatitis C Virus wird von Mensch zu Mensch über den parenteralen Kontakt zu virushaltigem Blut oder Blutprodukten übertragen (FIORDALISI et al. 1997; VON HAHN et al. 2010). Aufgrund der heutigen verbesserten technischen Möglichkeiten und standardisierten Untersuchungen ist der Übertragungsweg über Bluttransfusionen (SCHREIBER et al. 1996) mit Ausnahme von Infektionen in den Entwicklungsländern selten geworden. In den Entwicklungsländern herrscht zudem ein erhöhter Infektionsdruck in Gesundheitseinrichtungen, in denen nicht ausreichend gesäuberte und sterilisierte medizinische Produkte, insbesondere Spritzen und Nadeln, wiederverwendet werden (KANE et al. 1999; ILES et al. 2013; NEGRO 2014).

Mit der Verbreitung von Spritzen und Injektionsmaterialien im zwanzigsten Jahrhundert nahm die Ausbreitung des HCV stark zu (GLOBAL BURDEN OF HEPATITIS 2004). Drogenkonsumenten stellen seitdem eine Hauptrisikogruppe für HCV-Infektionen, insbesondere der Genotypen 1a und 3a dar (TREPO u. PRADAT 1999; PYBUS et al. 2005). Neben dem intravenösen Drogenmissbrauch konnte eine Studie von CONRY-CANTILENA et al. (1996) belegen, dass Personengruppen, die intranasal Kokain konsumieren, eine weitere Risikogruppe für HCV-Infektionen darstellen.