

Zuwendungsempfänger, ausführende Stelle:

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Virologie

Forschungsvorhaben:

FKZ: 2816HS002

GZ: 314-06.01-2816HS002

Thema:

Untersuchungen zur Verbreitung sowie Einschätzung des zoonotischen Potentials boviner Hepaciviren

Laufzeit:

01.06.2016 bis 30.11.2017

Berichtszeitraum:

01.06.2016 bis 30.11.2017

Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Abschlussbericht

Untersuchungen zur Verbreitung sowie Einschätzung des zoonotischen Potentials boviner Hepaciviren (FKZ 2816HS002)

Inhaltsverzeichnis

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens.....	3
1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens	3
1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	3
2. Material und Methoden	4
a. Serumproben und RNA Isolierung.....	4
b. Antikörper-ELISA.....	4
c. Klonierungsstrategie LIPS.....	4
d. SDS-PAGE und Western blot	5
e. Luziferase-Immunpräzipitationssystem (LIPS).....	5
f. Real-time RT-PCR	6
g. Reverse Transkription und nested Pan-Hepaci-PCR.....	7
3. Ergebnisse	7
3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	7
3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	12
4. Zusammenfassung	13
5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	13
6. Literaturverzeichnis.....	15

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Ziele in diesem Projekt umfassten die Untersuchung der Verbreitung sowie die Einschätzung des zoonotischen Potentials des bovinen Hepacivirus. Innerhalb des Projektes ergaben sich auf Grund dessen mehrere Aufgabenstellungen. Im Vordergrund stand die Entwicklung geeigneter Testverfahren um das Vorkommen viraler RNA und korrespondierender Antikörper in Probenmaterialien verschiedener Tierspezies und in humanem Material zu untersuchen. Des Weiteren sollte die am Institut für Virologie bestehende Probenbank um Serumproben verschiedener Tierspezies und um humanes Probenmaterial erweitert werden und diese Proben mit den neu entwickelten Testverfahren analysiert werden.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Alle geplanten Arbeitsschritte hinsichtlich Methodenentwicklung und Probenakquise von Serumproben unterschiedlicher Tierspezies sowie humaner Blutspender konnten eingehalten werden. Innerhalb des Projektzeitraumes wurden zwei serologische Testverfahren, sowie eine verbesserte Real-time PCR als auch eine breit reagierende Pan-Hepacivirus-PCR zur molekularen Diagnostik entwickelt und mehrere Probenkollektive untersucht. Während der Validierung des ersten entwickelten serologischen Verfahrens, dem E2-Antikörper-ELISA stellte sich heraus, dass höchstwahrscheinlich unspezifische Reaktionen mit dem Antigen die Testergebnisse verfälschen. Daraufhin wurde ein alternatives Testverfahren, ein sog. „*Luciferase immunoprecipitation system (LIPS)*“-Assay etabliert, so dass die vorangestellten Fragestellungen innerhalb der Projektlaufzeit dennoch erfolgreich bearbeitet werden konnten.

Ein problematischer Punkt verhinderte die vollständige Beantwortung der Frage, ob bovine Hepaciviren in der Pathogenese humaner Lebererkrankungen unbekannter Ursache eine Rolle spielen. Es wurden initial 100 Serumproben von entsprechenden Patienten mit Lebererkrankung mittels E2-Antikörper-ELISA und PCR untersucht. Es war geplant, die noch ausstehenden Testungen mittels NS3-LIPS direkt am UKE Hamburg durchzuführen. Dies war jedoch nicht möglich, da die entsprechenden Proben beim Kooperationspartner nicht mehr aufzufinden waren.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Infektionen mit Hepatitis C-Virus (HCV) verwandten Viren konnten in den letzten Jahren bei mehreren Tierarten nachgewiesen werden, u.a. bei Pferden, Nagetieren und Fledermäusen (1). Bovine Hepaciviren wurden 2015 zum ersten Mal in der Rinderpopulation beschrieben (2, 3). Sie weisen wie andere Vertreter des Genus „*Hepacivirus*“ (Familie *Flaviviridae*) die für Hepaciviren typische Genomorganisation auf. Der offene Leserahmen (ORF) der Plusstrang-RNA wird initial abgelesen und ein Polyprotein hergestellt, welches co- und posttranslational in die viralen Struktur- (Core, E1, E2, p7)- und Nicht-Strukturprotein (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) gespalten wird (2, 4). Obwohl die Infektion bislang nur bei Rindern nachgewiesen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Tierspezies und möglicherweise auch Menschen für eine Infektion mit bovinen Hepaciviren empfänglich sind. In einigen Studien gibt es Hinweise darauf, dass Hepaciviren unter Umständen nicht streng wirtsspezifisch sind. Burbelo und Kollegen detektierten während eines serologischen Screenings ein Rind, welches eine positive anti-NPHV-Antikörperreaktion aufwies (5). In-

vitro-Studien zeigten außerdem, dass NS3 von Hepaciviren unterschiedlicher Tierspezies das humane mitochondrial antiviral-signal protein (MAVS) *in vitro* spalten kann. MAVS ist ein wichtiges Adaptorprotein während der Regulierung der Interferonantwort auf Virusinfektionen, u.a. der HCV-Infektion, welches NF-kappaB und IRF 3 aktiviert (6).

Für den Nachweis der BovHepV-Infektion standen bis vor kurzem ausschließlich PCR-Methoden zur Verfügung. Laut Literatur werden jedoch nach HCV-Infektion Antikörper gegen alle Struktur- und Nichtstrukturproteine gebildet, die mittels einer Vielzahl an Immunoassays detektiert werden können (7, 8). Im Zusammenhang mit der equinen Hepacivirus („*Non primate hepacivirus*“, NPHV)-Infektion der Pferde wurden bereits erfolgreich LIPS-Assays verwendet (5, 9).

2. Material und Methoden

a. Serumproben und RNA Isolierung

Serumproben von Schweinen stammten von veterinärmedizinischen Untersuchungslaboren in Bayern und Baden-Württemberg. Equine Serumproben stammten aus der Pferdeklinik der Tierärztlichen Hochschule (TiHo) Hannover. Serumproben von Schafen und Ziegen wurden im Rahmen der Routinediagnostik entnommen und wurden von der Klinik für kleine Klautiere der TiHo Hannover bezogen. Des Weiteren wurden Blutproben von Rindern, die in die Rinderklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover eingeliefert wurden, mit in die Studie eingeschlossen. Nach Zentrifugation des Vollblutes wurde das Serum abgenommen und tiefgefroren bis zur Untersuchung auf Antikörper und virale RNA gelagert. Serumproben von Blutspendern wurden vom Blutspendedienst des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bereitgestellt. Außerdem wurden Serumproben von Patienten mit einer Lebererkrankung unbekannter Ätiologie vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bezogen. Die virale RNA wurde manuell (QIamp Viral RNA Mini Kit) oder automatisch (QIASymphony, Qiagen, Hilden) aus Serumproben nach Herstellerangaben extrahiert.

b. Antikörper-ELISA

Zur heterologen Expression des BovHepV-Hüllglykoproteins E2 wurde der Wirtsorganismus *Leishmania tarentolae* ausgewählt. Dieser zeichnet sich durch ein gegenüber Bakterien und Hefen stark verbessertes Glykosilierungsmuster aus und wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits zur Expression mehrerer viraler Antigene verwendet (10, 11). Wie im Zwischenbericht erläutert umfasste die Etablierung des ELISAs neben der Antigen-Expression mittels LEXSYcon2 Expression Kit (Jena Bioscience) die Optimierung der Kopplungsbedingungen des Antigens, sowie die Bestimmung der zu verwendenden Serum- und Konjugatverdünnungen.

c. Klonierungsstrategie LIPS

Die NS3 Helikasedomäne von BovHepV/463/Ger (GenBank Zugangsnummer KP641127) wurde unter Zuhilfenahme BovHepV-spezifischer Primer, die auch Sequenzen für Restriktionsschnittstellen enthielten mittels Phusion-Polymerase (New England Biolabs,

NEB) amplifiziert. Die Sequenzen der Primer lauteten wie folgt: pREN2_NS3fragm_BamHI_fwd (5`-GAGGGATCCGTTTGTACCACAC-3`) und pREN2_NS3fragm_XhoI_rev (5`-GAGCTCGAGTCAATTACAGTCAGTCAGTCAC-3`); Primersequenzen spezifisch für Restriktionsschnittstellen sind hier unterstrichen dargestellt. Das PCR-Produkt und der Vektor pREN2_CHV_NS3 (freundlicherweise von Peter Burbelo, Dental Clinical Research Core, NIDCR, NIH, Bethesda, MD, USA zur Verfügung gestellt) wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI geschnitten, mittels T4 Ligase (NEB) verbunden und in *E. coli* TOP10-Bakterien (Life Technologies) mittels Hitzeschocktransformation eingebracht. Antibiotikaresistente Klone wurden in LB-Medium kultiviert und die Vektorintegrität nach Präparation der Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdau und *Sanger*-Sequenzierung (LGC Genomics) überprüft.

d. SDS-PAGE und Western blot

Zwei Tage vor der Transfektion wurden 2×10^6 COS-1 Zellen (freundlicherweise bereitgestellt vom Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und bei 37°C kultiviert. Die COS-1 Zellen wurden mit 24 µg pREN2_Ruc_BovHepV_NS3 Plasmid unter der Verwendung von Lipofektamin 2000 transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde das Fusionsprotein Ruc_BovHepV_NS3 geerntet. Der Zellrasen wurde mit PBS und Lysepuffer (50mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 50% glycerol und Proteaseinhibitoren) gewaschen und mithilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale abgelöst. Nach einem dreifachen Einfrier- und Auftauprozess und Zentrifugation bei 14875 x g für 4 min bei 4°C wurden die Renillaluziferase-Lichteinheiten (*light units*, LU) im Zell-Lysat ermittelt. 1 µl Lysat wurde mit 8 µl PBS in einer 96 well Zellkulturmikroplatte (Greiner Bio-One) verdünnt und 100 µl Coelenterazin-Substrat (Renilla-Glo Luciferase Assay System, Promega) hinzugefügt. Direkt nach der Substratzugabe wurde die Lumineszenz mit einem Tecan GENios Pro reader gemessen. Die Expression des Renillaluziferase-NS3 Fusionsproteins wurde außerdem nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels Western Blot nachgewiesen. Dazu wurden 15 µL COS-1 Zelllysat in 15 µL Probenpuffer (2% SDS, 62,5 mM Tris, 10% Glycerin, 100 mM DTT) verdünnt und bei 95 °C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 20 µL des Lysats in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran gebettet. Unspezifische Bindungsstellen wurden über Nacht bei 4°C in 2% ECL blocking agent in TBS-Tween (0,02%)-Lösung abgesättigt. Für die Immunfärbung wurde als Erstantikörper ein monoklonaler Anti-Flag M2 Antikörper (Sigma) in einer Verdünnung von 1:1000 gefolgt von der Inkubation mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Maus Immunglobulin, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (DAKO; 1:2000) verwendet. Beide Antikörper wurden in 2% ECL blocking agent verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte dem ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) nach Herstellerangaben.

e. Luziferase-Immunpräzipitationssystem (LIPS)

Zunächst wurden die zu untersuchenden Serumproben, welche in Duplikaten gemessen wurden, 1:10 in Puffer A (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100, pH 7.5) in einer 96 well-Polypropylenmikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific) verdünnt und

für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einen Rotationsschüttler geschüttelt. Im nächsten Schritt wurden 40 µl Puffer A, 1×10^7 LU des Ruc_BovHepV_NS3 Fusionsproteins und 10 µl des verdünnten Serums in eine 96 well Filter-HTS-Platte (Millipore) überführt und ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 10 µl einer 15%igen Ultralink protein A/G Beadsuspension (Thermo Fisher Scientific) in Puffer A zugefügt und erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Resin-A/G-beads wurden achtmal mit 200 µl Puffer A und anschließend zweimal mit 200 µl PBS mithilfe eines EveryPrep Universalvakuumverteilers (Invitrogen) gewaschen. Die Lichteinheiten, welche proportional zu den an den beads gebundenen Antikörpern sind, wurden durch das Zufügen des Coelenterazin-Substrats (Promega) gemessen. Für die Standardisierung der LIPS-Parameter wurden sechs Kontrollen in jedem Test mitgeführt. Eine Negativkontrolle beinhaltete ausschließlich Puffer A, ein 1:100 verdünnter monoklonaler anti-FLAG M2 Antikörper (Sigma) diente als Positivkontrolle und vier verschiedene bovine Serumproben als interne negative bzw. positive Kontrollen.

f. Real-time RT-PCR

Wie im Zwischenbericht bereits erläutert wurde, wurden drei verschiedene Vorwärtsprimer, eine Sonde und ein Rückwärtsprimer, welche in einer hoch konservierten Genomregion (5' nicht translatierte Region (5'NTR)) binden sowie drei unterschiedliche kommerziell erhältliche Mastermixe für eine Verbesserung der Sensitivität und der Spezifität zum Nachweis des bovinen Hepacivirusgenoms getestet. Die Ergebnisse wie im Zwischenbericht dargestellt zeigten, dass die Verwendung des Vorwärtsprimers mit einer Produktlänge von 85 Nukleotiden und des Mastermix SuperScript III One Step RT-PCR System mit Platinum Taq DNA Polymerase die niedrigsten Ct-Werte aufzeigten und somit die höchste Sensitivität besaßen. Alle weiteren real-time RT-PCRs wurden mit dieser Primer-Sonden-Kombination und dem oben angeführten Mastermix durchgeführt. Die Sequenzen von Primer und Sonde sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Die Reaktion wurde mit folgendem Thermoprofil durchgeführt: 50°C für 30 Minuten (reverse Transkription), anschließend 95°C für 2 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden, 52°C für 30 Sekunden und 68°C für 30 Sekunden.

Name	Sequenz 5'3'
BovHepV_5NTR_fwd	AACCAGGCCCTAGTAG
BovHepV_5NTR_rev	GTACTCGGTCCTCCCA
BovHepV_5NTR_probe	CATGAGCCCTTCCCCACAGATTGAGTGGA
pan-hepaci_NS3_fwd	GCMCCTACKGGSTCYGGGAA
pan-hepaci_NS3_rev	TCRAAGTTCRCRGTGTAMCCMGTCAT
pan-hepaci_NS3_nested_fwd	GAYGTGRTCATYTGATGARTGCCA
pan-hepaci_NS3_nested_rev	CCSCGATAGTARGCSACWGC

Tab. 1: Auflistung der in der BovHepV-spezifischen Real-time PCR und in der Hepacivirus-übergreifenden Gel-basierten nested RT-PCR verwendeten Primer und Sonde.

g. Reverse Transkription und nested Pan-Hepaci-PCR

Für die cDNA Synthese wurde RNA aus Serumproben der Tierspezies Rind, Pferd und Schwein und RNA aus humanen Serumproben eingesetzt und in einer breit reagierenden *nested* PCR eingesetzt. Die Sequenzen der Oligos sind in **Tabelle 1** aufgelistet. Diese pan-hepaci Primer binden an hochkonservierten Bereichen in der NS3-Sequenz und ergeben ein Produkt von 655 bp in der ersten und 328 bp in der zweiten PCR. Die Primerpaare wurden nach NS3-Sequenzvergleich verschiedener Hepacivirus-Sequenzen abgeleitet. Mit in den Sequenzvergleich flossen folgende Hepacivirus-Sequenzen ein: NPHV (GenBank Zugangsnummern JQ434005 und JQ434007), HCV (NC004102, AB047639 und EF108306), Nager-Hepacivirus (KC411784, KC411796 und KC411807), Mantelaffen-Hepacivirus (KC551800), GBV-B (AF179612) und bovines Hepacivirus (KP641123 bis KP641127 und KP265942 bis KP265950). Beide PCR-Reaktionen wurden mit einem hot-start PCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific) und folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 95°C für 4 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen von 95°C für 30 Sekunden, 61°C für 30 Sekunden und 72°C für 45 Sekunden und finalen 5 Minuten bei 72°C (erste PCR); 95°C für 4 min, gefolgt von 40 Zyklen von 95°C für 30 Sekunden, 59°C für 30 Sekunden und 72°C für 30 Sekunden und finalen 5 Minuten bei 72°C (nested PCR). PCR-Produkte wurden in einem 1,5%igen Agarose-Gel aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht visualisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Serologie: Antikörper-ELISA

Wie im Zwischenbericht beschrieben konnte im Leishmania-Expressionssystem ein trunkiertes BovHepV E2-Protein erfolgreich exprimiert und zur Etablierung eines Antikörper-ELISAs verwendet werden. Mit diesem Test wurden Serumproben von Rindern und weiterer Tierspezies sowie humane Serumproben untersucht. Dabei wurden folgende Reaktionsraten ermittelt: Rind: 58,5 %, Schaf: 51,1 %, Ziege: 1,6 %, Schwein: 20,1 %, Mensch (Blutspender): 10 %. (**Abb. 1**).

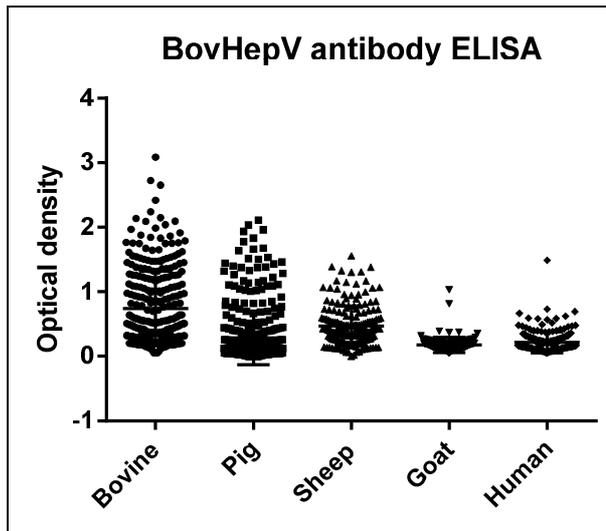


Abb.1: Reaktivitäten von Serumproben verschiedener Tierspezies und humaner Blutspender im E2-Antikörper-ELISA

Serologie: NS3-LIPS

Des Weiteren wurde ein BovHepV-NS3-LIPS etabliert und angewendet. Zunächst wurde die Expression des Renillaluziferase-NS3-Fusionsproteins mittels Western Blot untersucht. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte Zellen mitgeführt. Das Plasmid enthält neben der Renillaluziferase einen Flag-Tag, welcher für die Detektion des Fusionsproteins genutzt wurde. Die berechnete molekulare Masse des Fusionsproteins beträgt ca. 67 kDa. In **Abbildung 2** ist zu sehen, dass das Fusionsprotein in transfizierten COS-1-Zellen erfolgreich überexprimiert wurde.

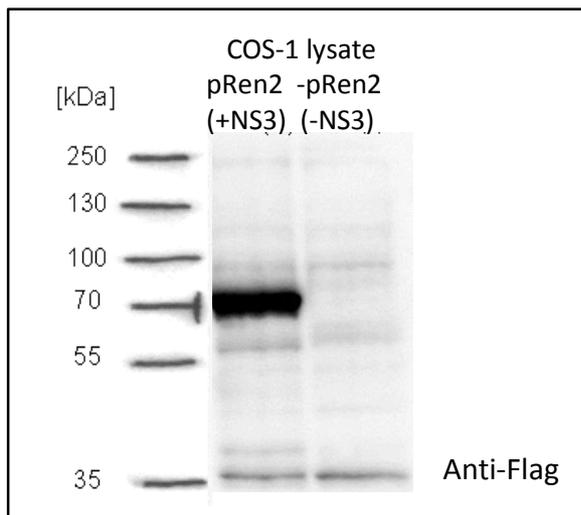


Abbildung 2: Western Blot von COS-1-Lysaten. Aufgetragen wurden ein Zell-Lysat nach Transfektion mit dem Plasmid pREN2_Ruc_BovHepV_NS3 und ein Lysat nicht-transfizierter Zellen. Das Fusionsprotein (Luziferase-NS3) wurde unter der Verwendung eines anti-Flag Antikörpers nachgewiesen.

Anschließend wurden im E2-Antikörper-ELISA positiv als auch negativ reagierende Serumproben der Spezies Rind, Schwein, Schaf und Mensch ausgewählt und im NS3-LIPS untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich im ELISA positiv reagierende Proben der Spezies Rind auch im NS3-LIPS positiv reagierten (**Abb. 3**).

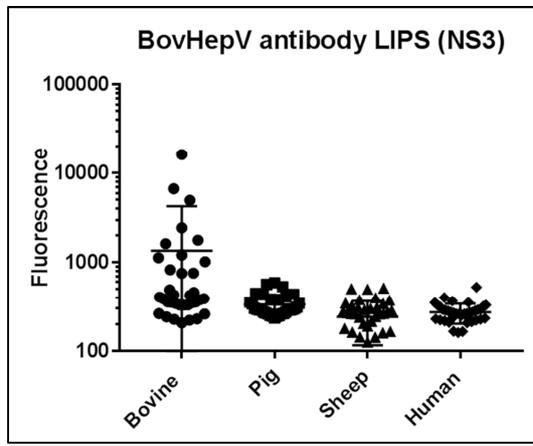


Abb. 3: Reaktivitäten von Serumproben verschiedener Tierspezies und humaner Serumproben im NS3-LIPS. Getestet wurden im E2-ELISA negativ sowohl positiv bewertete Serumproben.

Die sich deutlich unterscheidenden Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass der E2-Antikörper-ELISA möglicherweise unspezifische Reaktionen in anderen Spezies als Rind anzeigt. Auf Grund der beobachteten höheren Spezifität des NS3-LIPS, der darüber hinaus auch schon von anderen Arbeitsgruppen zur serologischen Diagnostik von Hepacivirus-Infektionen genutzt wurde (5, 9), fiel die Entscheidung, weitere Untersuchungen mit diesem Test durchzuführen.

Zunächst war es das Ziel, diesen Antikörpertest zu standardisieren. In **Abbildung 4A** sind die gemessenen Lichteinheiten der mitgeführten Kontrollen aus mehreren LIPS-Durchgängen aufgetragen. Obwohl die Messwerte der jeweiligen Kontrollen im selben Bereich zu finden sind, können gleichzeitig Variationen in jedem Durchlauf beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die Auswertung des Testes über die Berechnung eines S/P (*sample/positive control*)-Wertes und damit einer Normalisierung auf die interne positive Kontrolle vorgenommen. Eine von einem stark positiv reagierenden bovinen Serum (#27) angelegte Verdünnungsreihe zeigte im Bereich zwischen 17000 und 5000 LU einen nahezu linearen Abfall der Renilla-Luziferase LU (**Abb. 4B**). Die im unteren linearen Bereich reagierende interne positive Kontrolle (**a**) wurde im Folgenden zur Normalisierung aller erhaltenen Messwerte verwendet. Die S/P-Werte der mitgeführten Negativkontrollen bewegten sich im Bereich von 0,0-0,19, so dass als cut-off ein S/P-Wert von 0,2 gewählt wurde. Untersuchte Serumproben, die einen S/P-Wert von $\geq 0,2$ aufwiesen, wurden daher als positiv reagierend klassifiziert.

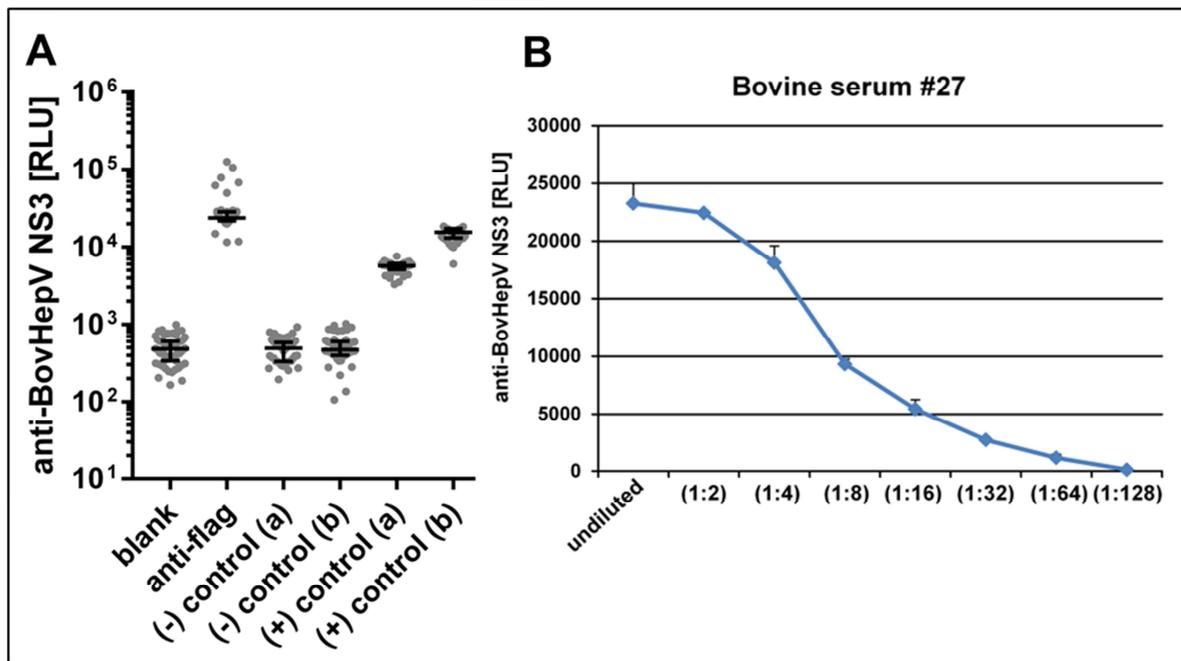


Abb. 4: **A:** Darstellung gemessener Luciferase-Lichteinheiten (RLU) der Negativkontrolle (blank), der Positivkontrolle (anti-Flag) und jeweils zwei negativen und zwei positiven bovinen Serumproben (interne Kontrollen). **B:** Verdünnungsreihe einer stark positiv getesteten bovinen Serumprobe im Verhältnis zu den gemessenen Renillaluziferase-Lichteinheiten [RLU].

Im Anschluss an die Etablierung des LIPS Testsystems für die Identifizierung von Antikörpern gegen BovHepV-NS3 wurden Serumproben verschiedener Tierspezies sowie humane Serumproben auf Antikörper gegen BovHepV-NS3 untersucht. Von 282 untersuchten bovinen Serumproben reagierten 56 (19,9%) positiv mit dem viralen Antigen. Die Spanne positiv reagierender Proben reichte dabei von S/P-Werten von 0,2 bis 6,59. Keine der getesteten humanen Serumproben reagierte mit dem BovHepV-Antigen. Von 200 porcinen Proben wiesen fünf Seren einen S/P-Wert knapp oberhalb des cut-offs auf. Auffällig war dabei eine Serumprobe mit einem starken Luziferase-Signal, die im NS3-LIPS wiederholt positiv befundet wurde. Neben einzelnen unspezifischen Reaktionen von Serumkomponenten mit dem Fusionsprotein könnte eine mögliche Ursache für die beobachteten Werte auch in Kreuzreaktivitäten mit einem anderen, soweit noch nicht identifizierten Hepacivirus oder eines anderen Virus aus der Familie der *Flaviviridae* liegen. Von 117 untersuchten equinen Proben wiesen 13 Serumproben (9,6%) einen Wert knapp über dem Cut-off von 0,2 auf (**Abb. 5**).

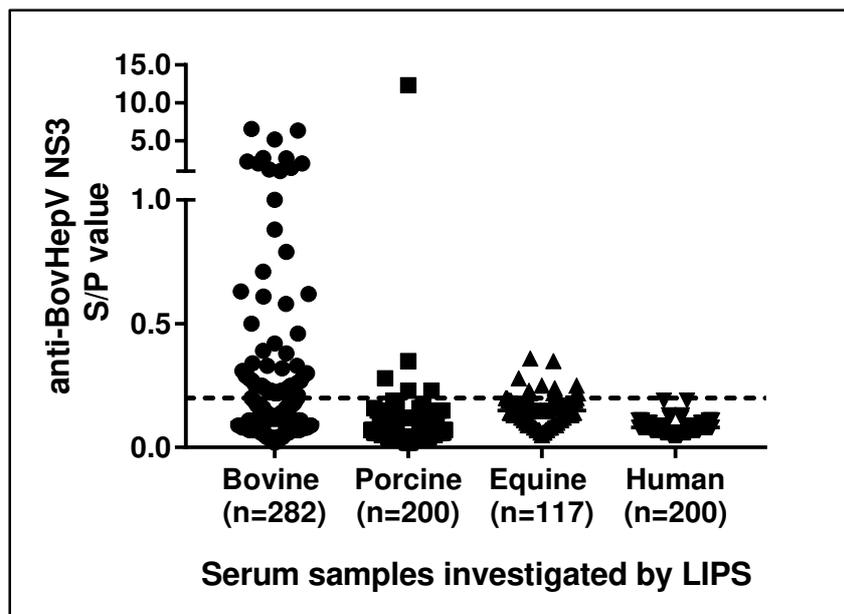


Abb. 5: Serologische Reaktionsraten (umgerechnet in S/P-Werte), welche in Serumproben verschiedener Tierspezies und humanen Serumproben gemessen wurden.

Real-time PCR und Pan-Hepaci-PCR

Nach Optimierung einer real-time RT-PCR zum spezifischen Nachweis des viralen Genoms unter Austestung verschiedener Primer-Sonden-Kombinationen und Reaktionsmische verschiedener Hersteller wurden die nachfolgenden Untersuchungen mit den in **Tabelle 1** genannten Primern und der entsprechenden Sonde durchgeführt. Mit dieser PCR wurden insgesamt 282 bovine und 200 porcine Proben untersucht, wobei 23 (8,2%) der bovinen Serumproben positiv auf BovHepV RNA getestet wurden.

Des Weiteren wurde eine pan-Hepaci PCR etabliert um weitere Tierspezies auf akute Virusinfektionen mit Erregern aus dem Genus *Hepacivirus* untersuchen zu können. Zunächst wurde RNA aus drei in der Real-time PCR negativ und drei positiv getesteten bovinen Serumproben in der Gel-basierten RT-PCR mit den Pan-Hepaci-Primern untersucht. Wie in **Abbildung 6A** zu erkennen ist, konnten aus den BovHepV-positiven Proben auch in der Pan-Hepaci-PCR ein Amplikon generiert werden; Eine dieser positiv getesteten Proben wurde in allen durchgeführten Pan-Hepaci-PCRs als Positivkontrolle mitgeführt. Insgesamt wurden Serumproben von 117 Pferden und 200 Schweinen, sowie 200 Serumproben von gesunden Blutspendern und 100 Serumproben von Patienten mit Lebererkrankung unbekannter Ursache untersucht. Sowohl die 200 porcinen Proben als auch die insgesamt 300 humanen Proben wurden in der Pan-Hepaci PCR negativ getestet (**Abb. 6C, D**). Dagegen konnten aus elf von 117 equinen Serumproben spezifische Amplikons generiert werden (**Abb. 6B**). Diese wurden mittels *Sanger*-Sequenzierung analysiert. Die Auswertung ergab, dass es sich hierbei um das equine Hepacivirus (NPHV) handelte.

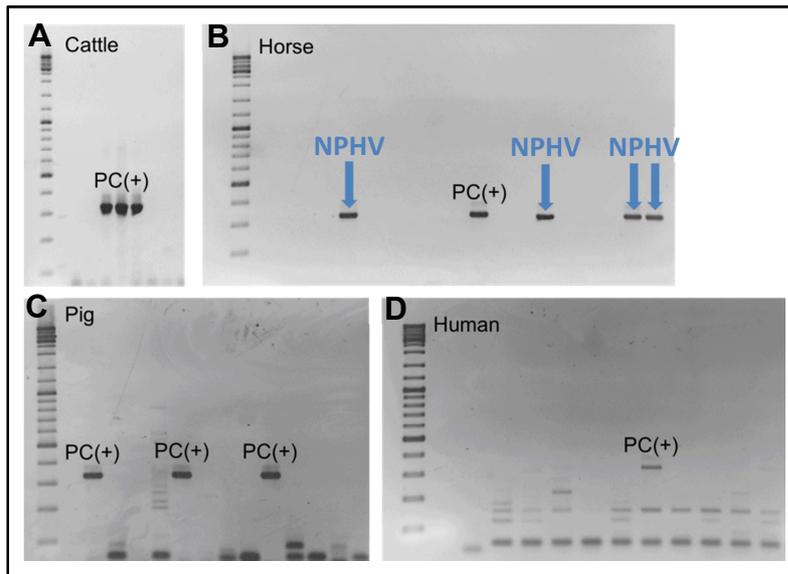


Abb. 6: **A, B:** Mit Hilfe der Gel-basierten nested Pan-Hepaci-PCR wurde sowohl BovHepV (*positive control*, PC(+)) als auch NPHV-spezifische virale RNA (blaue Pfeile) amplifiziert. Beispielhaft sind in **C** und **D** negative RT-PCR Ergebnisse aus porzinen und humanen Serumproben dargestellt.

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Infektionen mit anderen Hepaciviren zu Kreuzreaktionen im NS3-LIPS führen könnten. Wie weiter oben beschrieben, zeigten 9,6 % der hier untersuchten equinen Serumproben eine schwache Antikörperreaktion mit dem BovHepV-NS3-Antigen. Die Zirkulation equiner Hepaciviren (NPHV) in der Pferdepopulation ist dafür möglicherweise verantwortlich. Innerhalb des Genus *Hepacivirus* ist das virale Protein NS3 am stärksten konserviert (12) und ermöglicht aus diesem Grunde unter Umständen Hepacivirus-übergreifende Antigen-Antikörper-Reaktionen. Allerdings konnte in entsprechenden porzinen Serumproben keine virale RNA detektiert werden. Falls noch unbekannte Hepaciviren hier eine Rolle spielen sollten, besteht einerseits die Möglichkeit, dass diese nicht mit den hier verwendeten Methoden detektiert werden können, oder aber dass es sich um zurückliegende Infektionen mit noch nachweisbarer humoraler Immunantwort handelt. Die in diesem Projekt generierten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bovine Hepaciviren höchstwahrscheinlich an den bovinen Wirt adaptiert sind. Vereinzelt serologisch positive Reaktionen in anderen Wirten sind wahrscheinlich nicht als Zeichen regelmäßig stattfindender Wirtswechsel anzusehen. Weiterhin kann zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund der hier durchgeführten diagnostischer Untersuchungen nicht davon ausgegangen werden, dass gesunde Erwachsene für BovHepV-Infektionen empfänglich sind.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Ziel dieses Projektes war die Beantwortung der konkreten Frage, ob virale RNA oder Antikörper gegen bovine Hepaciviren in anderen Tierarten oder beim Menschen gefunden werden können. Darüber hinaus dienten die Arbeiten in diesem Projekt dazu, die generelle Anwendbarkeit der hier durchgeführten Arbeiten und Prozesse in einem allgemeineren Kontext zu überprüfen. Das in diesem Projekt erlangte Wissen hinsichtlich Planung und Durchführung künftiger ähnlicher Projekte stellt einen wesentlichen Nutzen dar. Der Prozess

der Etablierung und Anwendung der vorgestellten Testsysteme kann zukünftig unproblematisch auf weitere Erreger, für die sich ähnliche Fragestellungen ergeben übertragen werden. Beispielsweise können die für die Proteinexpression verwendeten Plasmide ohne großen Aufwand modifiziert und zur Herstellung weiterer viraler Antigene verwendet werden. Dabei wird der in diesem Projekt etablierte Workflow zur Etablierung diagnostischer Tests als Vorlage dienen. Konkret in diesem Projekt entwickelte Testverfahren können darüber hinaus bei Bedarf in Kooperation mit Industriepartnern kommerzialisiert werden.

4. Zusammenfassung

In diesem Projekt konnten mit der Etablierung einer optimierten Real-time PCR und dem NS3-LIPS-Assay Untersuchungen boviner Serumproben auf BovHepV-Infektionen durchgeführt werden. Des Weiteren ermöglichte die Entwicklung einer Pan-Hepaci-PCR die Identifikation weiterer Hepaciviren. Mit den dargestellten Methoden konnte einerseits die Verbreitung der Infektion in der Rinderpopulation untersucht werden und andererseits die Frage beantwortet werden, ob BovHepV-RNA und korrespondierende Antikörper in weiteren Tierspezies und humanen Serumproben nachzuweisen wären. Dabei wurde gezeigt, dass ca. 20 % der untersuchten Rinder Antikörper gegen BovHepV NS3 und ca. 8 % virale RNA im Serum aufwiesen. Unter den untersuchten Serumproben von Schweinen und Pferden konnten einzelne positive Antikörperreaktionen gemessen werden. Zumindest was die equinen Proben betrifft, können Kreuzreaktionen mit anderen Hepaciviren, in diesem Fall equinen Hepaciviren (NPHV) als Erklärung herangezogen werden, da nach den Ergebnissen der breit reagierenden Pan-Hepacivirus-PCR im untersuchten Probenkollektiv elf Pferd akut mit NPHV infiziert waren. In porcinen Serumproben konnte keine virale RNA nachgewiesen werden. Blutspender-Serumproben wurden negativ sowohl auf Antikörper als auch auf virale RNA getestet. Darüber hinaus konnte auch keine virale Nukleinsäure in humanen Patienten mit Lebererkrankung unklarer Genese detektiert werden. Ausgehend von den jetzigen Ergebnissen gehen wir davon aus, dass BovHepV höchstwahrscheinlich nicht auf andere Spezies als Rinder übertragen wird. Positive serologische Reaktionen müssen allerdings im Einzelfall noch abgeklärt werden. Die Untersuchung des Blutspenderkollektivs sowie der Hepatopathie-Patienten ergaben keinen Hinweis auf zoonotische Übertragung des Virus. Um eine solche endgültig auszuschließen, sollen jedoch in künftigen Projekten Proben von Risikogruppen wie z.B. Tierärzten, Schlachtern oder Landwirten mit den hier etablierten System untersucht werden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Prinzipiell konnten alle im Projekt geplanten Ziele mit wenigen Einschränkungen erreicht werden. Wie geplant, wurden mehrere diagnostische Tests zum Nachweis der BovHepV-Infektion entwickelt und bovine Serumproben sowie Proben weiterer Tierspezies und humane Serumproben untersucht. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnte die Verbreitung der Infektion in der Rinderpopulation untersucht werden. Darüber hinaus wurde die Fragestellung nach Wirtsspezifität und möglichem Zoonosepotential mittels Antikörpertestung und Anwendung von breit bindenden Pan-Hepacivirus-Primern untersucht. Die Analyse von

Serumproben von Blutspendern lieferte keinen Hinweis auf akute oder bereits stattgefundene Infektionen mit bovinen Hepaciviren. Eine vollständige Diagnostik an Serumproben von Patienten mit Lebererkrankung unbekannter Ursache konnte hier nicht wie geplant durchgeführt werden; es war leider nicht möglich, die entsprechenden Serumproben mittels NS3-LIPS zu untersuchen. Trotzdem konnten akute Hepacivirus-Infektionen durch Testung in einer Pan-Hepacivirus-PCR ausgeschlossen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Hartlage AS, Cullen JM, Kapoor A. 2016. The Strange, Expanding World of Animal Hepaciviruses. *Annu Rev Virol* 3:53–75.
2. Baechlein C, Fischer N, Grundhoff A, Alawi M, Indenbirken D, Postel A, Baron AL, Offinger J, Becker K, Beineke A, Rehage J, Becher P. 2015. Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. *J Virol* 89:7007–7015.
3. Corman VM, Grundhoff A, Baechlein C, Fischer N, Gmyl A, Wollny R, Dei D, Ritz D, Binger T, Adankwah E, Marfo KS, Annison L, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Becher P, Drosten C, Drexler JF. 2015. Highly divergent hepaciviruses from African cattle. *J Virol* 89:5876–5882.
4. Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff AS, Pletnev A, Rico-Hesse R, Stapleton JT, Simmonds P. 2016. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen Virol* 97:2894–2907.
5. Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henriquez JA, Mishra N, Wagner J, Tokarz R, Cullen JM, Iadarola MJ, Rice CM, Lipkin WI, Kapoor A. 2012. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J Virol* 86:6171–6178.
6. Anggakusuma null, Brown RJP, Banda DH, Todt D, Vieyres G, Steinmann E, Pietschmann T. 2016. Hepacivirus NS3/4A Proteases Interfere with MAVS Signaling in both Their Cognate Animal Hosts and Humans: Implications for Zoonotic Transmission. *J Virol* 90:10670–10681.
7. Chen M, Sällberg M, Sönnnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, Birkett A, Peterson D, Milich DR. 1999. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 116:135–143.
8. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for the Study of Liver Diseases. 2009. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49:1335–1374.
9. Pfaender S, Cavalleri JMV, Walter S, Doerrbecker J, Campana B, Brown RJP, Burbelo PD, Postel A, Hahn K, Anggakusuma null, Riebesehl N, Baumgärtner W, Becher P, Heim MH, Pietschmann T, Feige K, Steinmann E. 2015. Clinical course of infection and viral tissue tropism of hepatitis C virus-like nonprimate hepaciviruses in horses. *Hepatology* 61:447–459.
10. Baechlein C, Meemken D, Pezzoni G, Engemann C, Grummer B. 2013. Expression of a truncated hepatitis E virus capsid protein in the protozoan organism *Leishmania tarentolae* and its application in a serological assay. *J Virol Methods* 193:238–243.
11. Postel A, Meyer D, Petrov A, Becher P. 2017. Recent emergence of a novel porcine pestivirus: interference with classical swine fever diagnosis? *Emerg Microbes Infect* 6:e19.
12. Thézé J, Lowes S, Parker J, Pybus OG. 2015. Evolutionary and Phylogenetic Analysis of the Hepaciviruses and Pegiviruses. *Genome Biol Evol* 7:2996–3008.