

## *Diagnostik von Orthopockenviren mit molekularbiologischen Methoden*

H. Meyer<sup>1</sup>, M. Pfeffer<sup>2</sup>

**Einleitung** In den letzten 15 Jahren wurde wiederholt über Infektionen mit Orthopockenviren (OPV) bei Haus- und Zootieren berichtet (1, 11). Diese Erreger verursachen in der Regel lokale Infektionen, aber auch systemische Erkrankungen sind bekannt geworden. Da sie vor allem von Katzen auf den Menschen übertragen werden können, haben sie als Zoonoseerreger auch das humanmedizinische Interesse gefunden. Bei immunsupprimierten Personen können schwere, zyklisch verlaufende Allgemeinerkrankungen auftreten. Tödlich endete eine solche Infektion bei einem 18jährigen, der nicht gegen Pocken Schutzgeimpft war (4). Die bisher isolierten Erreger wurden unabhängig von der Tierart, von der sie stammten, aufgrund ihres biologischen Verhaltens den sogenannten Kuhpockenviren zugerechnet (2, 13). Diese bilden eine der insgesamt neun Spezies des Genus Orthopoxvirus (siehe Tab. 1). Die bekannteste Spezies, das Variolavirus, wurde von der WHO 1980 offiziell für ausgerottet erklärt. Entsprechend einer internationalen Vereinbarung sollen noch vorhandene Virusbestände 1995 vernichtet werden.

Da sich die einzelnen Spezies im Genus Orthopoxvirus untereinander serologisch und morphologisch einheitlich verhalten, beruht die Differenzierung auf Methoden, die während des WHO-Ausrottungsprogramms entwickelt wurden. Dazu zählen vor allem die Beurteilung der Pockenherde auf der Chorioallantoismembran embryonierter Hühnereier sowie das Wachstumsverhalten in der Zellkultur (6, 10). Die Beurteilung der entsprechenden Veränderungen setzt jedoch ein erhebliches Maß an Erfahrung voraus. Aber auch modernere Methoden werden eingesetzt, wie z. B. die Untersuchung des viralen Genoms mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Diese Untersuchungen ergaben, daß alle OPV-Spezies über einen einheitlichen, zentralen Genombereich verfügen. Unterschiede zwischen den Spezies sind durch die Länge der terminalen Fragmente und die hier stark variierende Schnittstellenverteilung bedingt. Dies resultiert in einem unterschiedlichen Wanderungsverhalten der DNS-Fragmente in der Gelelektrophorese und bestätigt im wesentlichen die aufgrund biologischer Kriterien getroffene Einteilung (5, 9). Allerdings liegen bisher nur Daten von einigen wenigen Referenzstämmen vor. Lediglich für die Spezies Affenpockenvirus wurden im Zusammenhang mit der Pockenerradikation eine ganze Reihe von Isolaten untersucht (5).

Die erst vor wenigen Jahren beschriebene Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) hat die mikrobiologische Diagnostik insofern revolutioniert, da im Gegensatz zu den oben beschriebenen Methoden auf eine Isolierung des Agens verzichtet werden kann. In eigenen Untersuchungen konnte bereits die grundsätzliche Eignung der PCR zur Differenzierung einzelner OPV-Spezies gezeigt werden (12).

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, die Eignung der Restriktionsenzymanalyse sowie der PCR im Hinblick auf eine Identifizierung und Differenzierung von Orthopockenvirus-Isolaten zu überprüfen.

Tabelle 1:

Spezies des Genus *Orthopoxvirus*\*

Spezies	Wirtsspektrum	Verbreitung
Variolavirus	eng: Mensch	früher weltweit
Vacciniavirus	breit: Mensch, Büffel, Kaninchen, etc.	Indien (Büffelpocken)
Affenpockenvirus	breit: Affe, Mensch, Nager	Zentralafrika
Kamelpockenvirus	eng: Kamel	Afrika, Asien
Kuhpockenvirus	breit: Kuh, Feliden, Nager, Mensch	Europa, GUS
Mäusepockenvirus	eng: Maus	Europa
Waschbären-Pockenvirus	eng: Waschbär	Amerika
California vole-Pockenvirus	eng: Wühlmaus	Amerika
Tatera-Pockenvirus	eng: Nager	Westafrika

\*) Einteilung nach dem "5<sup>th</sup> report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (7).

## Methoden

### Zellkulturen und Viren

Für die Untersuchungen standen 48 OPV-Isolate bzw. Stämme zur Verfügung. Einschließlich der Referenzstämme waren dies 9 Vacciniavirus-Stämme, 22 Kuhpockenvirus-Isolate, 10 Isolate von Kamelen, 6 Isolate von Mäusen sowie ein Affenpockenvirus-Stamm. Die Kuhpockenvirus-Isolate stammten von verschiedenen Wirtsspezies wie Katze, Hund, Elefant, Rind, Ratte, Gepard und Mensch. Alle Viren waren aufgrund biologischer Verfahren den jeweiligen

gen OPV-Spezies zugeordnet worden. Für die Vermehrung diente die Zelllinie MA 104, die nach Standardmethoden kultiviert wurde (3).

### Restriktionsenzymanalyse

Die Präparation von gereinigten Virussuspensionen für die Isolierung der viralen DNS erfolgte in Anlehnung an die von CZERNY und MAHNEL (1990) beschriebene Methode. Für die Untersuchung mit Restriktionsendonukleasen wurde die virale DNS mit den entsprechenden Enzymen nach Anweisung des Herstellers (Boehringer Mannheim) verdaut. Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte in 0,6 bis 1,0% Agarose-Gelen.

### Amplifikation von DNS durch PCR

Die PCR-Reaktion erfolgte wie kürzlich beschrieben (12). Die Lage der Primer ATI-up-1 und ATI-low-1 (5'-AATACAAGGAGGATCT-3' bzw. 5'-CTTAACCTTTTCTTTCTC-3') sowie der von ihnen überspannte Bereich ist für die Spezies Kuhpocken-, Vaccinia-, Mäusepocken-, Kamelpocken- und Affenpockenvirus in Abbildung 1 dargestellt. Aufgrund von unterschiedlich großen Deletionen im Vergleich zum Kuhpockenvirus-Referenzstamm Brighton ergeben sich für die Referenzstämme der anderen Spezies unterschiedlich große Amplifikationsprodukte (siehe Abb. 1). Reaktionsansätze mit Parapocken- und Hühnerpockenvirus-DNS bzw. Ansätze ohne DNS dienten als Kontrollen.

## Ergebnisse

### Untersuchung des Genoms mit Restriktionsenzymen

Das Wanderungsmuster der HindIII-Fragmente von sieben Vacciniavirus-Stämmen sowie von einem Isolat vom Menschen ist in Abbildung 2 A dargestellt. Bemerkenswert ist die Ähnlichkeit im Wanderungsmuster dieser Vacciniavirus-Stämme. Unterschiede finden sich lediglich in der Länge des zweit- und drittgrößten Fragments, die als die terminalen Fragmente identifiziert werden konnten (nicht gezeigt). Bei den Stämmen Elstree und M1 (Spur 2 und 3) setzt sich der rechte Terminus wegen einer zusätzlichen HindIII-Schnittstelle aus zwei Fragmenten zusammen. Beim Isolat 85/1 (Bahn 5), das aus Pustelmaterial vom Menschen angezüchtet und aufgrund seiner biologischen Eigenschaften als Vacciniavirus charakterisiert wurde, vermutete man eine Laborinfektion mit Vacciniavirus. Dies wird durch die Ergebnisse der Restriktionsenzymanalyse bestätigt. Um zu überprüfen, ob das Isolat 85/1 (Bahn 5) mit einem der untersuchten Stämme identisch ist, wurde die Länge der terminalen Fragmente verglichen. Lediglich der Stamm IHD-J (Bahn 4) wies gleich lange terminale Fragmente auf wie das Isolat 85/1. DNS dieser beiden Stämme sowie eines ähnlich aussehenden Stammes (Levaditi, Bahn 6) wurde daher mit fünf weiteren Enzymen (BamHI, EcoRI, Sall, XhoI und KpnI) untersucht. Dabei erwiesen sich für alle verwendeten Enzyme die Fragmentgrößen von 85/1 und IHD-J als identisch, der Stamm Levaditi unterschied sich jedoch eindeutig in der Größe mehrerer Fragmente (Daten nicht gezeigt). Mit großer Sicherheit kann daher angenommen werden, daß es sich bei dem Humanisolat 85/1 um den Vacciniavirus-Stamm IHD-J handelt.

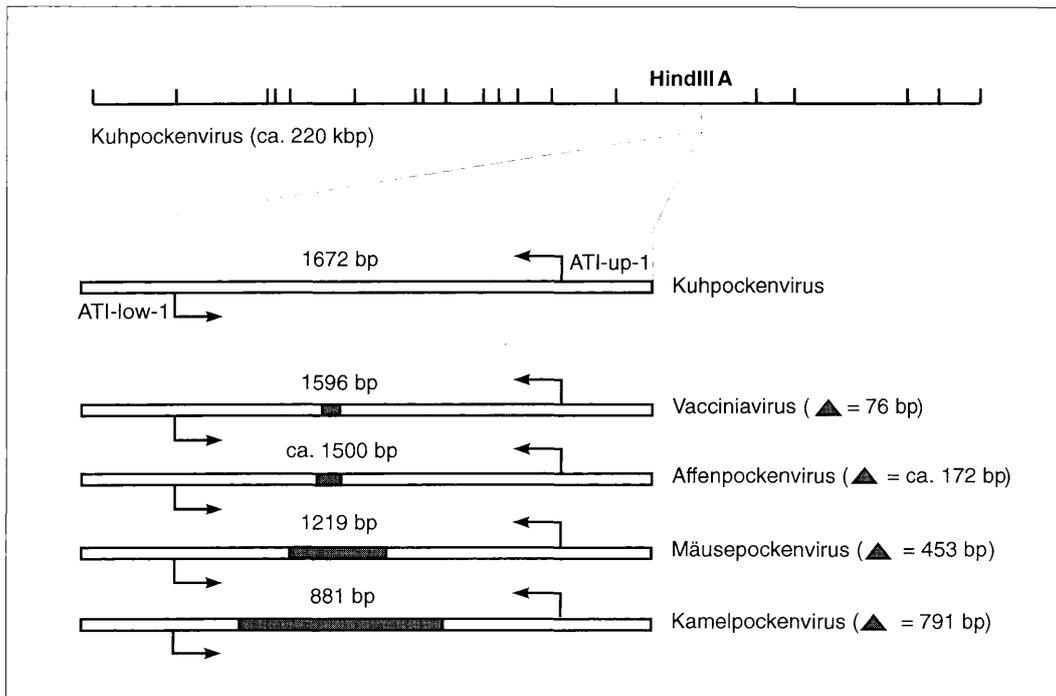


Abbildung 1:

Lage und Länge des durch die PCR-Primer ATI-up-1 und ATI-low-1 umschlossenen Sequenzbereichs im Genom von Kuhpockenvirus Stamm Brighton. Die Länge der entsprechenden Amplifikate von Vacciniavirus Western Reserve, Mäusepockenvirus MP-1, Kamelpockenvirus CP-1 und Affenpockenvirus Kopenhagen ist angegeben.

DNS-Fragmente amplifizieren lassen (siehe Abb. 1). Um zu überprüfen, ob sich die ermittelten Größenunterschiede auch für die zur Verfügung stehenden OPV-Isolate und Stämme bestätigen lassen, wurde deren DNS amplifiziert. Nach Elektrophorese zeigten sich regelmäßig nur vier verschiedene Fragmentgrößen. Ein Fragment mit einer Größe von ca. 1.220 bp fand sich bei allen als Mäusepockenvirus charakterisierten Isolaten. Ähnlich verhielt es sich für die 10 Isolate von Kamelen: hier war immer ein 880 bp Fragment nachweisbar. Sieben der 9 Vacciniavirus-Stämme (Fragmentgröße 1.600 bp) konnten von den 22 als Kuhpockenviren klassifizierten Isolaten unterschieden werden (Fragmentgröße 1.670 bp). Von 2 Vacciniavirus-Stämmen ließ sich jedoch mit dem verwendeten Primerpaar keine DNS amplifizieren. Zur Bestätigung der Spezifität der Amplifikate wurden diese mit dem Enzym Bgl II untersucht. Hier kam es zum Teil zu ganz unterschiedlichen Wanderungsmustern, die sich aber für die einzelnen Spezies als charakteristisch erwiesen. Der beobachtete geringe Größenunterschied nach Amplifikation von Vaccinia- und Kuhpockenvirus-Stämmen (1.596 zu 1.672 bp, siehe Abb. 1) stellte sich nach Bgl-II-Verdau durch die bessere Trennleistung für kleinere Fragmente wesentlich deutlicher dar. Die beiden Spezies unterscheiden sich nur in der Größe von zwei Bgl-II-Fragmenten. Während Kuhpockenvirus ein 480 und ein 420 bp Fragment aufweist, so beträgt die Größe der entsprechenden Fragmente für Vacciniavirus 430 und 400 bp (nicht gezeigt).

Tabelle 2:

Differenzierung von Orthopockenvirus-Isolaten mit Hilfe der PCR

OPV-Spezies	Anzahl der Stämme/Isolate	PCR und Verdau der Applikate mit Bgl II
Vacciniavirus	9	7
Kuhpockenvirus	22	22
Kamelpockenvirus	10	10
Mäusepockenvirus	6	6
Affenpockenvirus	1	1

Hind-III-Wanderungsmuster sind für einige Isolate der Spezies Kamel-, Mäuse- und Kuhpockenvirus in den Abbildungen 2 B, 3 A und 3 B beispielhaft aufgetragen. Während alle Isolate, die zur Spezies Mäusepockenvirus oder Kamelpockenvirus gehören, ein für diese Spezies nahezu identisches und damit charakteristisches Muster aufweisen, so finden sich innerhalb der Spezies Kuhpockenvirus deutliche Unterschiede bezüglich Größe und Zahl der Hind-III-Fragmente bei den einzelnen Isolaten (Abb. 3 B).

#### Polymerase Kettenreaktion

In früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, daß sich mit der PCR für die Referenzstämme unterschiedlich große

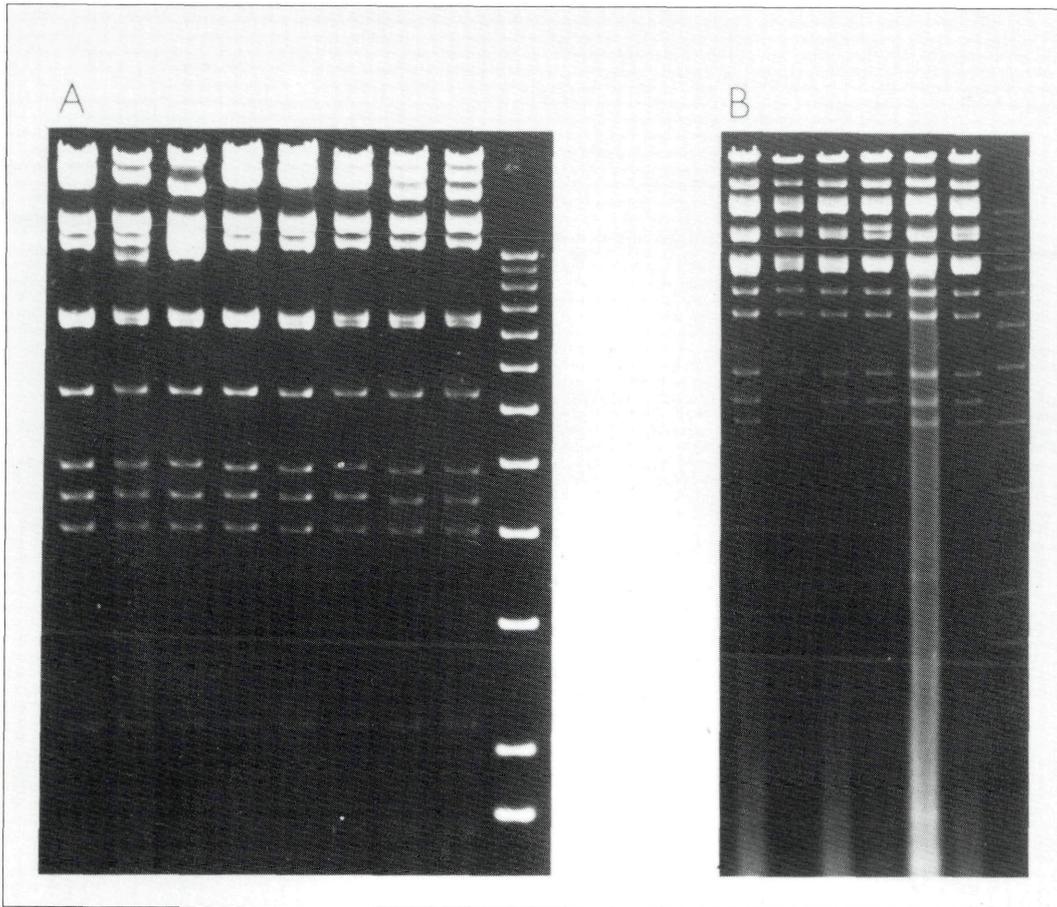


Abbildung 2:  
Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS nach Verdau mit dem Restriktionsenzym Hind III. In A ist der Vergleich des Isolates 85/1 (Bahn 5) mit 7 Vacciniavirus-Stämmen dargestellt. In B ist das Wanderungsmuster von 6 Kamelpockenvirus-Isolaten gezeigt.

Die bisher nur für Referenzstämme gezeigten Unterschiede im Wanderungsmuster nach Verdau mit dem Restriktionsenzym Hind III konnten nun auch für die Spezies Kamelpocken-, Mäusepocken- und Vacciniavirus anhand einer größeren Zahl von Isolaten bestätigt werden. Damit lassen sich zukünftig Isolate den entsprechenden Spezies anhand der Beurteilung des Wanderungsmusters ihrer DNS-Fragmente zuordnen. Darüberhinaus können bestimmte Stämme individuell identifiziert werden, wie z. B. attenuierte Impfstämme oder etwa Kontaminationen. So konnte eine Laborinfektion eindeutig auf den Vacciniavirus-Stamm IHD-J zurückgeführt werden. Ein nahezu identisches Muster wurde für Isolate von Kamelen beobachtet, die alle 1993/94 in Dubai isoliert wurden. Die enge Verwandtschaft, die von NAIDOO et al. (1992) für Kuhpockenvirus-Isolate von Katzen und Rindern aus England beschrieben wurde, konnte hingegen nicht bestätigt werden: die untersuchten Isolate aus Deutschland weisen eine viel größere Variation auf.

Mit Hilfe der PCR ist innerhalb kurzer Zeit ein Nachweis und zugleich eine Differenzierung von OPV-Isolaten möglich. Aufgrund der für die OPV-Spezies charakteristischen Fragmentgrößen sowie des erhaltenen Wanderungsmusters nach Bgl II-Verdau der Amplifikate war eine eindeutige Zuordnung von Isolaten möglich. Diese stimmte bei allen 46 amplifizierbaren Isolaten mit der Speziesenteilung überein, die aufgrund biologischer Kriterien getroffen wurde (Tab. 2). Somit bestätigen diese Ergebnisse nicht nur die für die Spezies Vaccinia-, Kamelpocken- und Mäusepockenvirus durch Sequenzierung ermittelten Deletionsgrößen, sondern können wegen ihrer Konstanz auch als speziesspezifisch angesehen werden. Die fehlende

## Diskussion

Die in letzter Zeit bekannt gewordenen OPV-Infektionen von Mensch und Tier erfordern diagnostische Verfahren, mit denen diese Erreger eindeutig identifiziert und differenziert werden können. Während die Zuordnung zum Genus Orthopoxvirus durch z. B. den Nachweis der typischen Partikel im Elektronenmikroskop leicht möglich ist, so ist für eine Differenzierung die Anzucht des Erregers erforderlich. Die Kreuzreaktivität der einzelnen OPV-Spezies untereinander hat bisher die Isolierung von streng speziesspezifischen monoklonalen Antikörpern verhindert (6). Es wurden auch noch keine für eine Differenzierung mit Hilfe der DNS-Hybridisierung einsetzbaren speziesspezifischen Sequenzen beschrieben. Daher wurde als Methode die Restriktionsenzymanalyse des Genoms sowie die PCR gewählt.

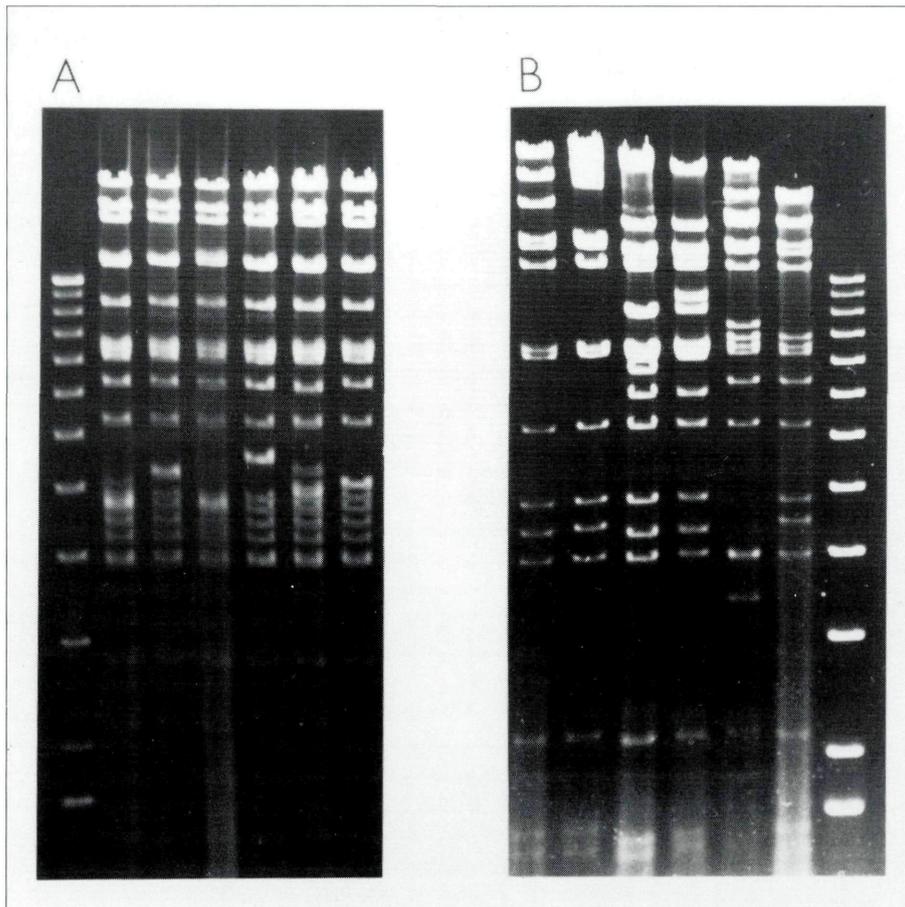


Abbildung 3:

Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS nach Verdau mit dem Restriktionsenzym HindIII. In A ist das Wanderungsmuster von 6 Mäusepockenvirus-Isolaten, in B ist das Wanderungsmuster von 6 Kuhpockenvirus-Isolaten gezeigt.

### Zusammenfassung

Nach Verdau der viralen DNS von 48 Orthopockenvirus (OPV)-Stämmen und -Isolaten mit dem Enzym Hind III wurden die Wanderungsmuster verglichen. Das Muster verschiedener Vaccinia-, Mäusepocken- und Kamelpockenvirus-Isolate erwies sich dabei als nahezu konstant für die jeweilige Spezies. Die Muster der 22 untersuchten Kuhpockenvirus-Isolate dagegen verhielten sich uneinheitlich. Mit Hilfe der PCR konnten mit Ausnahme von 2 Vaccinia-virus-Stämmen alle OPV-Stämme/Isolate aufgrund der Größe der Amplifikationsprodukte und des typischen Wanderungsmusters nach Bgl-II-Verdau eindeutig den verschiedenen OPV-Spezies zugeordnet werden.

**Schlüsselwörter** Orthopockenviren, PCR, Restriktionsenzymanalyse, Diagnostik.

### Summary *Detection of orthopoxviruses using molecular techniques*

The Hind III restriction enzyme patterns of 48 orthopoxvirus (OPV) strains and isolates were compared. The patterns observed for vaccinia, mousepox and camelpox virus were unique and isolates belonging to either species displayed nearly identical patterns. However, the 22 cowpox virus isolates behaved different. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with

Amplifikation für zwei Vacciniavirus-Stämme steht im Einklang mit Sequenzdaten (8, 12), da hier im Primerbindungsbereich Deletionen vorhanden sind. Mit der PCR konnten Isolate verschiedenster Herkunft (Mensch, Elefant, Rind, Gepard, Katze, Hund) klassifiziert werden, die aufgrund phänotypischer Unterschiede als Kuhpockenvirus-ähnlich bezeichnet wurden (2) und die nach Restriktionsenzymverdau der viralen DNS stark variierende Wanderungsmuster aufweisen. Nach den hier vorliegenden PCR-Daten handelt es sich eindeutig um Isolate der Spezies Kuhpockenvirus. Damit erweist sich die PCR den klassischen Differenzierungsmethoden sowie der Restriktionsenzymanalyse des Genoms als überlegen. Die mit der PCR ermittelten Ergebnisse wurden mit gereinigter viraler DNS erzielt. Eine Zeit- und Arbeitersparnis für die Diagnostik ergibt sich natürlich erst dann, wenn auch der Nachweis viraler DNS z. B. aus Krustenmaterial gelingt und somit die Isolierung des Erregers entbehrlich ist. Erste Versuche mit Krustenmaterial von Kamelen mit nachgewiesener OPV-Infektion (freundlicherweise überlassen von U. Wernery, Dubai) verliefen erfolgversprechend.

the 48 OPV strains as well. With the exception of two vaccinia virus strains all strains tested could be unambiguously allocated to an OPV species based on the characteristic size and the unique Bgl II-pattern of the amplified DNA.

**Key words** Orthopoxvirus, PCR, restriction enzyme analysis, diagnosis.

### Literatur

1. BAXBY, D. (1988):  
Human poxvirus infection after the eradication of smallpox.  
*Epidem. Inf.* 100, 321-334.
2. BENETT, M., GASKELL, R. M., GASKELL, C. J., BAXBY, D., KELLY, D. F. (1989):  
Studies on poxvirus infection in cats.  
*Arch. Virol.* 104, 19-33.
3. CZERNY, C. P., MAHNEL, H. (1990):  
Structural and functional analysis of Orthopoxvirus epitopes with neutralizing monoclonal antibodies.  
*J. Gen. Virol.* 71, 2341-2352.
4. CZERNY, C. P., EIS-HÜBINGER, A. M., MAYR, A., SCHNEWEIS, K. E., PFEIFF, B. (1991):  
Animal poxviruses transmitted from cat to man: current event with lethal end.  
*J. Vet. Med. B.* 38, 421-431.
5. ESPOSITO, J. J., KNIGHT, J. C. (1985):  
Orthopoxvirus DNA: Comparison of restriction profiles and maps.  
*Virology* 143, 230-251.
6. FENNER, F., WITTEK, R., DUMBELL, K. R. (1989):  
The orthopoxviruses.  
Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
7. FRANCKI, R. I. B., FOUQET, C. M., KNUDSON, D. L., BROWN, F. (1991):  
Classification and nomenclature of viruses.  
*Arch. Virol. Suppl.* 2; Springer Verlag, Wien-New York.
8. GOEBEL, S. J., JOHNSON, G. P., PERKUS, M. E., DAVIS, S. W., WINSLOW, J. P., PAOLETTI, E. (1990):  
The complete DNA sequence of vaccinia virus.  
*Virology* 179, 247-266.
9. MACKETT, M., ARCHARD, L. C. (1979):  
Conservation and variation in orthopoxvirus genome structure.  
*J. Gen. Virol.* 45, 683-701.
10. MAHNEL, H. (1974):  
Labordifferenzierung der Orthopockenviren.  
*Zbl. Vet. Med. B.* 21, 242-258.
11. MAHNEL, H. (1991):  
Katzenpocken in Deutschland.  
*Tierärztl. Praxis* 19, 419-422.
12. MEYER, H., PFEFFER, M., RZIHA, H.-J. (1994):  
Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of Orthopoxvirus species by polymerase chain reaction.  
*J. Gen. Virol.* 75, 1975-1981.
13. NAIDOO, J., BAXBY, D., BENETT, M., GASKELL, R. M., GASKELL, C. J. (1992):  
Characterization of orthopoxviruses isolated from feline infections in Britain.  
*Arch. Virol.* 125, 261-272.

**Korrespondenzadresse:** PD Dr. Hermann Meyer  
Institut für Mikrobiologie, Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr  
Neuherbergstraße 11  
D-80937 München · Bundesrepublik Deutschland

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1995

Band/Volume: [17](#)

Autor(en)/Author(s): Meyer Hermann, Pfeffer Martin

Artikel/Article: [Diagnostik von Orthopockenviren mit molekularbiologischen Methoden. 189-194](#)