

**Untersuchungen zur Prävalenz und Transmission von
humanen Circoviren am Beispiel nigerianischer
Patienten einer speziellen Ambulanz für
Geschlechtskrankheiten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Junker, geb. Baumgärtner Ute Sabine

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Flehmig

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Klingel

meinem Ehemann Christian

und meinen Eltern Ruth und Peter gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	iii
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	v
TABELLENVERZEICHNIS	vi
1 EINLEITUNG	1
1.1 Taxonomie und Genotypgruppen.....	2
1.2 Genomorganisation	6
1.3 Replikation und Gewebetropismus.....	11
1.4 Transmission humaner Anelloviren	12
1.5 Prävalenz humaner TT-Viren	13
1.6 Klinik und Pathogenese humaner Anelloviren.....	16
1.7 Zielsetzung.....	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Materialien.....	19
2.2 Methoden	23
2.2.1 DNA-Extraktionen	23
2.2.2 Virusnachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.3 Agarosegelelektrophorese	24
2.2.4 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten	25
2.2.5 Nachweis von SEN-Virus spezifischen Antikörpern mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	25
3 ERGEBNISSE	27
3.1 Nachweis von TTV und SENV in Seren nigerianischer Patienten.....	27
3.2 Prävalenz des TT-Virus und eine mögliche Korrelation mit dem Auftreten von Geschlechtskrankheiten.....	29
3.3 Sequenzen der SEN-Virus-Isolate der nigerianischen Seren.....	32
3.4 Nachweis von SENV-spezifischen Antikörpern mittels ELISA unter Verwendung vier verschiedener Antigene	38
3.5 Nachweis von SENV in Schweinen und Rindern	39

4 DISKUSSION	44
4.1 Vergleich der Prävalenzen von SENV und TTV mit HIV, Hepatitis A, Hepatitis B und Hepatitis C	44
4.2 TTV und SENV Prävalenz im untersuchten Patientenkollektiv einer Ambulanz für Geschlechtskrankheiten in Lagos, Nigeria.....	46
4.3 Nachweis SENV-spezifischer Antikörper mittels ELISA	47
4.4. Korrelation von Alter und Geschlecht mit einer Anellovirusinfektion	49
4.5 Korrelation von Geschlechtskrankheiten mit einer Anellovirusinfektion .	49
4.6 Genetische Variabilität	50
4.7 SENV-Prävalenz bei Schweinen und Rindern in Deutschland	51
4.8 Ausblick.....	52
5 ZUSAMMENFASSUNG	54
6 LITERATURVERZEICHNIS	56
7 Erklärung zum Eigenanteil.....	68
Danksagung.....	69
Lebenslauf.....	70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	amino acid (Aminosäure)
A	Adenin
AMV	Avian myeloblastosis virus
BFDV	beak and feather-disease virus
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
conc.	concentration (Konzentration)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Deoxyribonukleinsäure)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
G	Guanin
HAV	Hepatitis-A-Virus
HbsAg	Hepatitis B surface Antigen (Hepatitis B Oberflächenantigen)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEV	Hepatitis-E-Virus
HGV	Hepatitis-G-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgM	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
kbp	Kilobasenpaar
M	Molarität
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
nt	Nukleotid
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PCV	Porcines Circovirus

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (im Blut zirkulierende Monozyten)
PicV	Pigeon circovirus
VP	Virusprotein
RDA	Representative Differentialanalyse
RNase	Ribonuklease
rpm	revolution per minute (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunde
seq	Sequenz
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris buffered saline/Tween20
TE	Tris-EDTA
TLMV	Torque Teno Like Mini Virus
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-hydroxymethylaminoethan
TTMDV	Torque-Teno-Midi-Virus
TTMV	Torque-Teno-Mini-Virus
TTV	Torque-Teno-Virus
U	Uracil
UNAIDS	United Nations Programme on HIV/AIDS
UTR	Untranslated region (nicht translatierte Region)
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Taxonomie von Viren mit zirkulärer Einzelstrang-DNA.....	2
Abbildung 2: Einteilung der TT-Viren in fünf Hauptgruppen anhand der N22-Region des offenen Leserahmens 1.....	5
Abbildung 3: TTV-Stammbaum mit 103 TTV-Isolaten nach Jelcic <i>et al.</i> (2004).....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des zirkulären TTV-Genoms am Beispiel des Isolates VT416.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der vier offenen Leseraster und der drei zugehörigen TTV-mRNAs des TTV-Genotyps 1.....	9
Abbildung 6: Genomorganisation von SENV-D und SENV-H.....	9
Abbildung 7: GC-reiche Region zwischen Nukleotid 3732 bis 3853 am Beispiel des TTV-Isolates TA278.....	10
Abbildung 8: Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der TTV-PCR..	28
Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der SENV-PCR.	29
Abbildung 10: Alignment von neun SENV-Sequenzen von nigerianischen Patienten und den SENV-Genotypen A bis H.	36
Abbildung 11: Dendrogramm von SENV A-H und 26 sequenzierten SENV-Amplifikaten	37
Abbildung 12: Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der SENV-PCR der Rinderseren.....	40
Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der SENV-PCR der Schweineseren.....	40
Abbildung 14: Alignment der 5 SENV-Sequenzen von 2 Schweinen und 3 Rindern.	43

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Häufigkeitsverteilung von sechs verschiedenen TTV-Genotypen im Serum und neun unterschiedlichen Geweben einer <i>post mortem</i> untersuchten Person.....	12
Tabelle 2:	TTV-Prävalenz in der Bevölkerung verschiedener geographischer Regionen.	15
Tabelle 3:	Weltweite SENV-Prävalenzen.....	16
Tabelle 4:	Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Seren von 50 Personen (36 Männer, 14 Frauen), die 1986 in einer Ambulanz für Haut und Geschlechtskrankheiten in Nigeria gesammelt worden waren	20
Tabelle 5:	Häufigkeit von TTV Infektionen und Geschlechtskrankheiten innerhalb einer Studienpopulation von 50 nigerianischen Patienten.....	31
Tabelle 6:	Durchschnittsalter der Patienten mit bzw. ohne Anellovirus-Infektion	32
Tabelle 7:	Zuordnung der sequenzierten Isolate zu den SENV-Prototypsequenzen	38
Tabelle 8:	Nachweis SENV-spezifischer Antikörper mittels ELISA in 47 untersuchten Seren unter Verwendung vier verschiedener Peptide und Vergleich mit den PCR-Ergebnissen.....	39

1 EINLEITUNG

Das erste humane DNA Virus mit einem einzelsträngigen, zirkulären Genom wurde 1997 von Nishizawa *et al.* (1997) identifiziert. Er untersuchte das Serum eines 58-jährigen Mannes mit akuter Hepatitis unklarer Ätiologie, der nach einer Bluttransfusion bis auf das 10-fache der Norm erhöhte Transaminasen entwickelt hatte. Mittels repräsentativer Differenzialanalyse (RDA; Lisitsyn *et al.* 1993) klonierte er Sequenzen des bis dahin unbekanntes Virus. Es wurde zunächst entsprechend den Initialen des Patienten als TT-Virus (TTV) bezeichnet (Okamoto *et al.* 1998a, 1999c), inzwischen steht das Akronym TT aber für *torque teno* lateinisch „dünne Kette“. Bis heute konnte jedoch noch kein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Hepatitis und dem TT-Virus nachgewiesen werden (Charlton *et al.* 1998, Shimizu *et al.* 2000, Springfield *et al.* 2000, Fabris *et al.* 2000). Es gab immer wieder Fälle von Posttransfusionshepatitis, die mit den bekannten Erregern Hepatitis A bis E nicht zu erklären waren und als Non-A-E Hepatitiden bezeichnet wurden (Alter *et al.* 1995). Zusätzlich gab es Fälle von Hepatitiserkrankungen unklarer Ätiologie bei denen serologisch kein Virus nachgewiesen werden konnte (Kodali *et al.* 1994). Dies ließ vermuten, dass es noch andere, bisher unbekannte humane, hepatotrope Viren gibt.

Ein eng mit TTV verwandtes Virus wurde 1999 von Primi *et al.* aus dem Serum eines mit HIV infizierten Drogenabhängigen isoliert und nach den Initialen des Patienten SEN-Virus benannt. Auch hier konnte letztlich kein direkter Zusammenhang zwischen einer akuten SEN-Virus-Infektion und einer transfusionsbedingten Ausbildung einer Non-A-E Hepatitis bewiesen werden, dennoch wurde das Virus als möglicherweise leberpathogen eingestuft (Primi *et al.* 2000).

1.1 Taxonomie und Genotypgruppen

Zu den sechs Virusfamilien, die ein einzelsträngiges zirkulär geschlossenes DNA Genom besitzen, zählen die *Circoviridae*, *Anelloviridae*, *Nanoviridae*, *Microviridae*, *Inoviridae* und *Geminiviridae* (Abbildung 1), wobei nur Vertreter der *Circoviridae* und *Anelloviridae* Vertebraten infizieren.

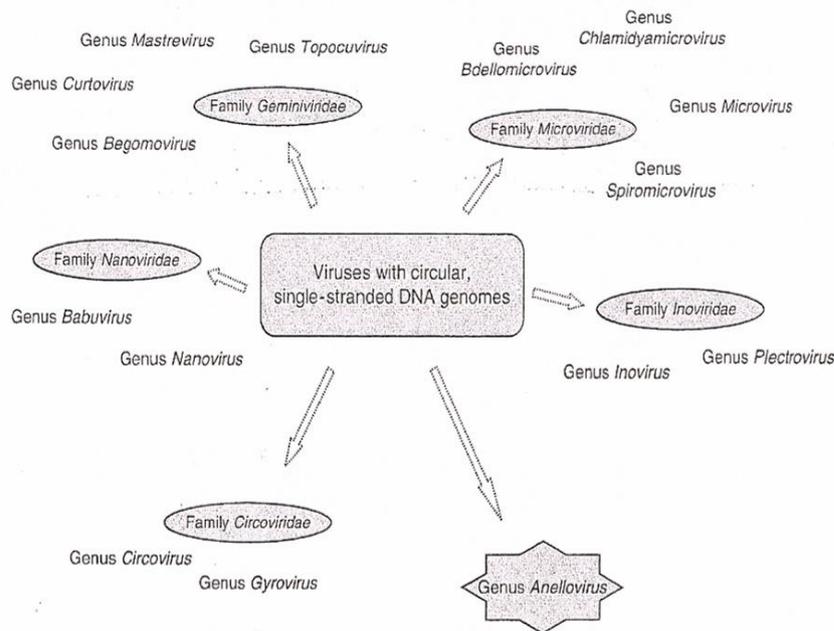


Abbildung 1: Taxonomie von Viren mit zirkulärer Einzelstrang-DNA (Quelle: ICTV Report 2005).

Circoviridae

Die Familie der *Circoviridae* umfasst zwei verschiedene Gattungen von Viren mit einem Genom aus einzelsträngiger, zirkulärer DNA mit negativer oder *ambisense* Polarität. Die Mitglieder dieser Familie sind Erreger von Krankheiten bei Vögeln und Schweinen. Die Gattung *Circovirus* beinhaltet das *beak and feather-disease virus* (BFDV), die porcinen Circoviren 1 und 2 (PCV1/2), das *pigeon circovirus* (PiCV), das *goose circovirus* (GoCV), das *canary circovirus* (CaCV) und das *duck circovirus* (DuCV). Zur Gattung *Gyrovirus* zählt lediglich das *chicken anemia virus* (CAV). Mit Ausnahme von PCV1 sind alle Circoviren pathogen: BFDV ruft bei Papageien einen Federverlust und Störungen bei der Verhornung des Schnabels hervor. PiCV, GoCV, DuCV führen zu

Wachstumsstörungen und einer verminderten Immunabwehr. PCV1 zeigte nach experimentellen Infektionen keine Assoziation mit Krankheitssymptomen, im Gegensatz dazu ist PCV2 der Erreger des *postweaning multisystemic wasting* Syndroms (PMWS) beim Schwein. Das CAV führt bei frisch geschlüpften Küken zu Anorexie, Anämie und systemischen Blutungen, was zu einer Mortalität bis zu 50 % der infizierten Tiere führen kann.

Anelloviridae

Trotz der Ähnlichkeit zwischen CAV und TTV im Aufbau und der Genomstruktur, werden die Torque-Teno-Viren der eigenständigen Familie der *Anelloviridae* zugeordnet. Diese umfasst drei verschiedene Gattungen (Carstens *et al.* 2010), die sich in ihrer Genomgröße unterscheiden (Takahashi *et al.* 2000a): die Alphatorqueviren mit den Torque-Teno-Viren (TTV), die Betatorqueviren mit den Torque-Teno-Mini-Viren (TTMV) und die Gammatorqueviren mit den Torque-Teno-Midi-Viren (TTMDV). Anelloviren sind genetisch äußerst variabel, was sich in der großen Anzahl von Subtypen widerspiegelt (Peng *et al.* 2002, Khudyakov *et al.* 2000). Als möglicher Grund für die hohe Heterogenität werden Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen TTV- und TTMV-Genotypen angesehen (Biagini *et al.* 2001, Worobey *et al.* 2000). Anelloviren sind ubiquitär verbreitet und wurden im Menschen, in Primaten, aber auch in Haustieren nachgewiesen (Leary *et al.* 1999a).

Genotypisierung TTV

Zur Genotypisierung von TT-Viren wird meist eine 22 Nukleotide lange Region im ORF1 (offenes Leseraster 1) genutzt, die als N22-Region bezeichnet wird (Nishizawa *et al.* 1997). Es wurde eine Variabilität von bis zu 40 % auf DNA-Ebene für unterschiedliche TTV-Varianten nachgewiesen (Jelcic *et al.* 2004). Seit der ersten Isolation des TT-Virus wurden bis heute jedes Jahr neue Isolate gefunden und die Taxonomie dementsprechend immer wieder geändert und ergänzt. Aus dem Serum eines Patienten, der an einer akuten Non-A-E Hepatitis erkrankt war, wurde eine neue Variante, genannt YONBAN, isoliert

(Takahashi *et al.* 2000a). 2002 wurde dann JT33F isoliert (Peng *et al.* 2002). Trotz ihrer hohen genetischen Variabilität haben alle Isolate Gemeinsamkeiten und zwar eine kodierende Region, welche die beiden offenen Leserahmen ORF1, ORF2 und weitere ORFs umfasst, sowie eine nicht kodierende und eine GC-reiche Region. Die Genomgrößen der einzelnen Isolate sind mit ca. 3.800 bp ebenfalls ähnlich. Abbildung 2 zeigt eine auf Sequenzanalysen beruhende Einteilung der TT-Viren in fünf Hauptgruppen. Dabei wird Gruppe 1 von Isolat TA278, Gruppe 2 von PMV, Gruppe 3 von TUS01, SANBAN und den SEN-Viren, Gruppe 4 von YONBAN und die Gruppe 5 von JT33F repräsentiert. Zur Gruppe 1 gehören die TTV-Genotypen 1-6, in der Hauptgruppe 2 befinden sich die Genotypen 7, 8, 17, 22 und 23. Die Hauptgruppe 3 enthält neben den Genotypen 9 bis 16 und 18 bis 20 den SEN-Genotyp mit seinen 8 Protogenotypen A – H, die sich ihrerseits auf drei Untergruppen verteilen. Eine Untergruppe umfasst die Genotypen A, D, F und G, die zweite SEN-Virus B und E und die dritte SEN-Virus H und C. Die vorliegende Arbeit folgt der Einteilung in 5 Hauptgruppen von Peng *et al.* (2002) wie sie in Abbildung 2 dargestellt ist und versteht SENV als einen der Genotypen von TTV. Die Gruppe 4 besteht bisher nur aus dem Isolat YONBAN. Der Hauptgruppe 5 sind die Prototyp-Isolate JT33-08, JT34-03, JT34-04, CT44-02, CT23-11 und CT39-25 zugeordnet.

Eine andere Einteilung wurde von Jelcic *et al.* (2004) vorgeschlagen (siehe Abbildung 3). Die TT-Viren wurden vier verschiedenen Gattungen (alpha bis delta) mit einer jeweiligen Sequenzhomologie von 50 – 60% zugeordnet. Isolate mit einer Übereinstimmung von 60 – 90% sollten dann als gleiche Spezies und bei einer Übereinstimmung des gesamten Genoms von mehr als 90% als identischer Genotyp bezeichnet werden. Dieser Vorschlag wurde aber im achten Report des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Biagini *et al.* 2005) nicht aufgegriffen, so dass weiterhin die Einteilung von TTV in fünf Gruppen gebräuchlich ist.

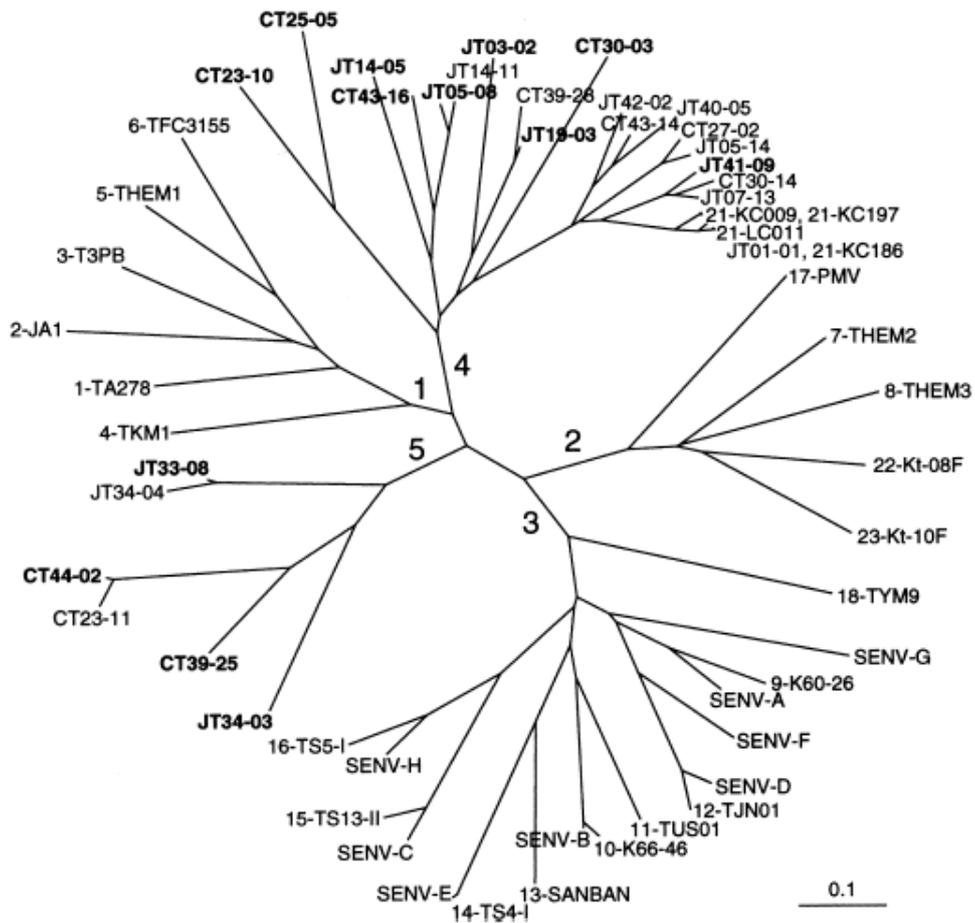


Abbildung 2:
Einteilung der TT-Viren in fünf Hauptgruppen anhand der N22-Region des offenen Leserahmens 1 (Quelle: Peng *et al.* 2002).

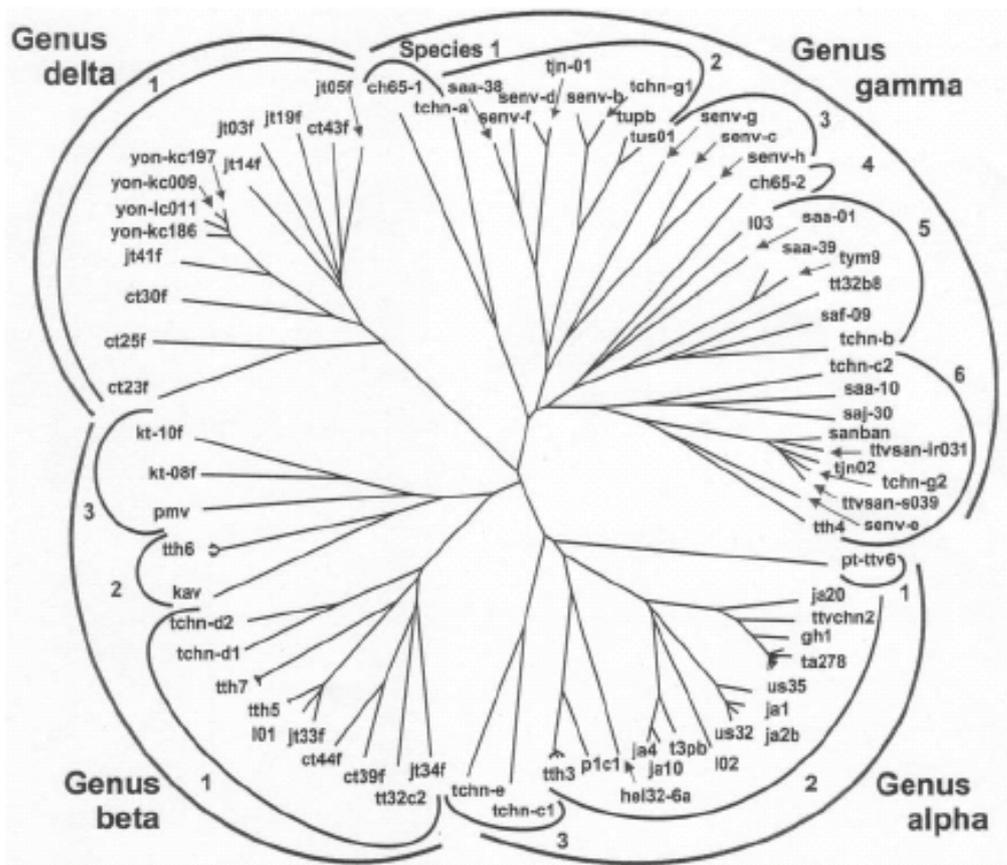


Abbildung 3:
TTV-Stammbaum mit 103 TTV-Isolaten nach Jelcic et al. (2004).

1.2 Genomorganisation

Im Folgenden wird die Genomorganisation der TT-Viren vorgestellt und auf die Charakteristika der verschiedenen Leseraster eingegangen. Die Abbildung 4 gibt eine schematische Übersicht über die Anordnung der 5 offenen Leserahmen im TTV-Genom.

Offener Leserahmen 1 (ORF1)

Erker *et al.* (1999) sequenzierten 151 TTV-Isolate; alle besaßen einen ORF1 von 770 Aminosäuren, welche 2,31 kbp entsprechen. Man vermutete, dass ORF1, der DNA-bindende Eigenschaften besitzt, das Gen für das Nukleokapsid

codiert. Man fand zudem stark konservierte Regionen, die für essenzielle Virusproteine und ein Replikationsprotein kodieren (Hafner *et al.* 1997, Koonin *et al.* 1993).

Offener Leserahmen 2 (ORF2)

ORF2 kodiert für 202 Aminosäuren. Welche Proteine daraus entstehen, ist jedoch noch unklar; es könnte sich um Proteine handeln, die an der Replikation beteiligt sind oder aber eine Phosphataseaktivität besitzen (Peters *et al.* 2002).

Offener Leserahmen 3 (ORF3)

In allen elf Isolaten wurde ein dritter ORF (ORF3) nachgewiesen, der abwärts von ORF1 an Nukleotidposition 2904 - 3075 liegt, (Erker *et al.* 1999, Asabe *et al.* 2001), dessen Funktion aber bisher noch nicht geklärt ist.

Offene Leserahmen 4 und 5 (ORF 4 und 5)

Bei anderen TTV-Isolaten wurden weitere offene Leserahmen gefunden, von denen unbekannt ist, wofür sie kodieren (Okamoto *et al.* 2000b, Okamoto *et al.* 2001, Mariscal *et al.* 2002, Kamada *et al.* 2004). In Abbildung 5 sind die einzelnen ORFs beispielhaft für den Genotyp 1 des TTV-Genoms dargestellt.

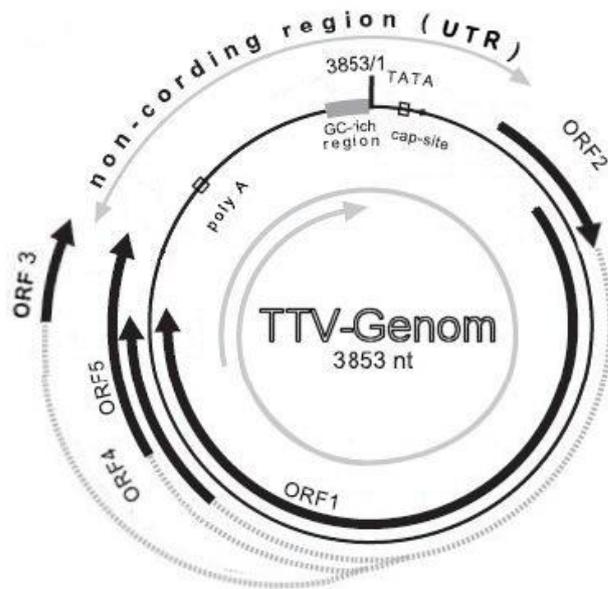


Abbildung 4:

Schematische Darstellung des zirkulären TTV-Genoms am Beispiel des Isolates VT416. Die Pfeile geben die Ausrichtung des Leserasters an. Die gestrichelten Linien symbolisieren die Introns. Die dünne Kreislinie stellt die nicht kodierende Region (UTR) dar, in deren Mitte die GC-reiche Region liegt (grauer Balken); hier befindet sich auch die TATA-Box und das Polyadenylierungssignal (Quelle: Okamoto *et al.* 1999a modifiziert von Rifai 2007).

Kodierende Region

Kamahora *et al.* (2000) identifizierten drei mRNAs mit einer Länge von 1.0 kbp, 1.2 kbp und 3.0 kbp. Die 3.0 kbp lange mRNA entstammt dem ORF1, welcher für ein Protein mit 770 Aminosäuren kodiert, das eine auffällig hohe Anzahl der Aminosäuren Arginin und Lysin im N-terminalen Bereich aufweist. Diese bedingen eine starke Hydrophobizität, wie sie auch im Kapsidprotein (VP1) der Circoviren gefunden wurde (Nishizawa *et al.* 1999). Daher erscheint eine stabilisierende und schützende Funktion dieses Proteins als wahrscheinlich. Weil das Kapsidprotein in der hypervariablen Region liegt, kann sich das Virus leicht dem Immunsystem des Wirtes entziehen und als persistierende Infektion etablieren. Diese hypervariablen Regionen finden sich in fast allen TTV-Genotypen.

Die 1.2 kbp lange mRNA besitzt zusätzlich zu der Spleißstelle an Nukleotidposition 185 und 277 eine zweite zwischen Position 711 und 2374. Die Verknüpfung dieser Nukleotide bewirkt, dass ORF2 mit ORF3 verbunden wird. Das

von ORF2 kodierte Protein ist 120 Aminosäuren lang und kodiert ein an der viralen Replikation beteiligtes Strukturprotein. In Abbildung 5 sind die 3 mRNAs schematisch dargestellt.

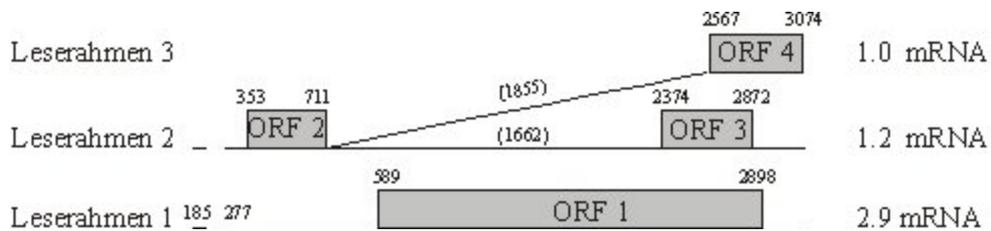


Abbildung 5:

Schematische Darstellung der vier offenen Leseraster und der drei zugehörigen TTV-mRNAs des TTV-Genotyps 1 (Quelle: Kamahora et al. 2000).

Innerhalb der Anelloviren bildet das SEN-Virus einen der vielen verschiedenen Genotypen des TT-Virus. Die Forschergruppe um Tanaka *et al.* (2001a) fand heraus, dass das Genom von SENV-D 3788 bp lang ist und dasjenige von SENV-H 3815 bp. Damit sind sie etwas kürzer als der Prototyp des TTV-Genoms (TA278) mit 3853 bp. Die Isolate A – H besitzen mit TA278 eine Sequenzhomologie von 33,1 – 36,5 %. SENV besitzt 3 offene Leseraster, deren Anordnung zueinander für die beiden Genotypen SENV-D und SENV-H in Abbildung 6 gezeigt ist.

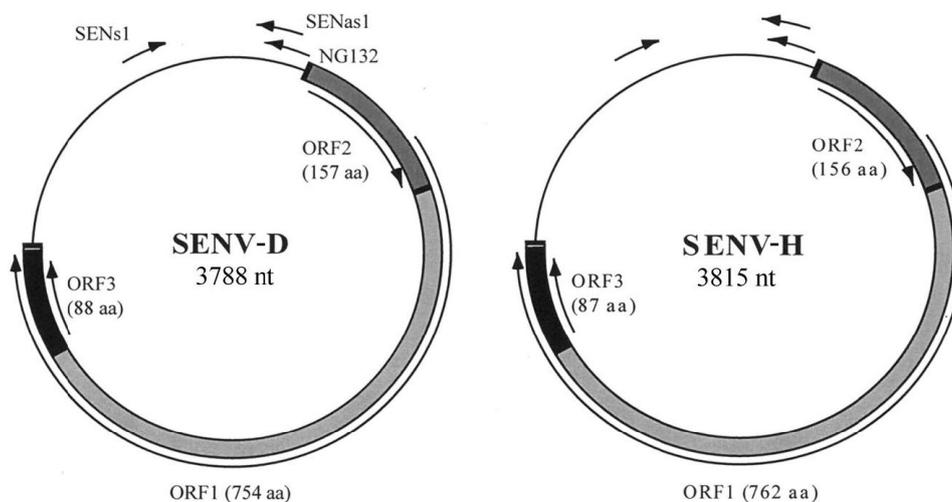


Abbildung 6:

Genomorganisation von SENV-D und SENV-H (Quelle: Tanaka et al. 2001a)

In der N-terminalen Region des ORF1 von SENV-D und SENV-H gibt es ebenfalls einen an Arginin und Lysin reichen Bezirk, wie er auch im TTV-Prototyp, anderen TTV-Varianten sowie CAV vorkommt. In SENV-A und SENV- B fehlt eine Übereinstimmung in diesem Bereich (Tanaka *et al.* 2001a).

Nicht kodierende Region

Die nicht kodierende Region entspricht mit einer Länge von 1132 bp ungefähr 1/3 des TTV-Genoms. Mehr als 90 % dieser Sequenz bestehen aus den Basen Guanin und Cytosin. Der nicht kodierende Genomteil entzog sich lange Zeit einer genauen Analyse, weil diese Region Haarnadelstrukturen (stem-loops) aufweist und dadurch die Bindung von PCR-Primern innerhalb dieses Bereichs erschwert wird. Man geht davon aus, dass diese GC-reiche Region eine wichtige Rolle für die Virusreplikation spielt (Miyata *et al.* 1999).

Die in Abbildung 7 gezeigte Sequenz beinhaltet die GC-reiche Region zwischen Nukleotid 3739 und 3853, die durch Punkte markiert ist (Okamoto *et al.* 1999a).

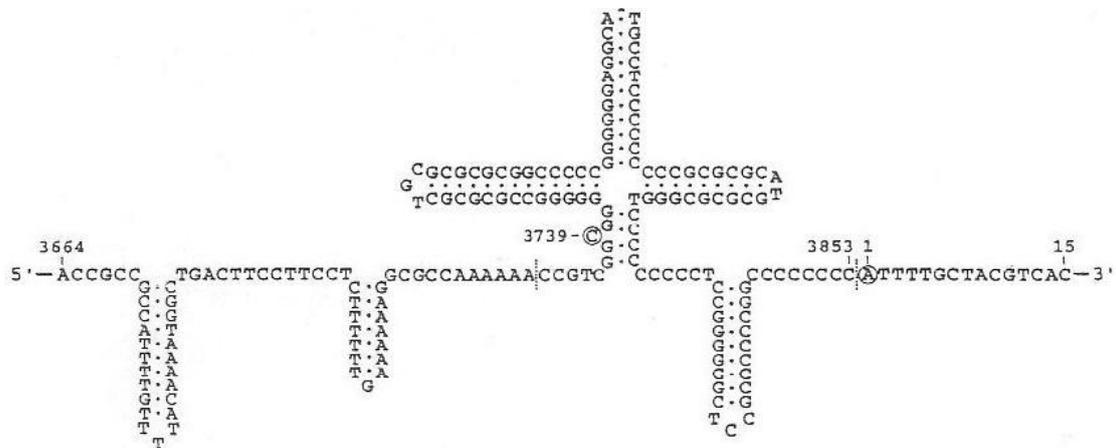


Abbildung 7:

GC-reiche Region zwischen Nukleotid 3732 bis 3853 am Beispiel des TTV-Isolates TA278 (Quelle: Okamoto *et al.* 1999).

1.3 Replikation und Gewebetropismus

Circo- und Anelloviren durchlaufen während ihrer Replikation Phasen mit doppelsträngiger DNA (dsDNA). Mushahwar *et al.* (1999), Niagro *et al.* (1998) und Niel *et al.* (2005) gehen davon aus, dass die Replikation in Form eines „rolling circle“ abläuft. Die doppelsträngige DNA wurde im Fall von TTV in Hepatozyten und Knochenmarkszellen gefunden, jedoch nicht in den im Blut zirkulierenden Monozyten (Okamoto *et al.* 2000a). TTV kann also hämatopoetische Vorläuferzellen infizieren und sich in ihnen replizieren, nicht jedoch in frei im Blut zirkulierenden Monozyten. Reife TT-Viren vom Genotyp 3 und 4 konnten aber in Monozyten detektiert werden; dies lässt vermuten, dass dieses Zellkompartiment als Reservoir genutzt wird (Okamoto *et al.* 2000a).

Wie bereits für die mit TTV verwandten Circoviren beschrieben, müssen virale Proteine mit zellulären interagieren, um die Replikation zu initiieren. Dafür kodieren Circoviren sogenannte replikationsassoziierte Proteine mit speziellen Replikationsmotiven (Mankertz *et al.* 1998, Niagro *et al.* 1998). Im ORF1 liegen vergleichbare Replikationsmotive vor (Erker *et al.* 1999). Hijikata *et al.* (1999) und Peng *et al.* (2002) fanden jedoch auch in der nicht translatierten Region Sequenzen für replikationsassoziierte Proteine. Durch das Einbringen des TTV-Genoms (VT416) in COS1-Zellen mit Hilfe eines Plasmidvektors konnten Kamahora *et al.* (2000) und Leppik *et al.* (2007) drei verschiedene mRNAs (2,8 - 3,0 kbp, 1,2 kbp, 1,0 kbp) exprimieren. Sie gingen aber davon aus, dass auch alternative Spleißvarianten exprimiert werden.

TT-Viren wurden in gastrointestinalen Tumoren sowie in Brust- und Lungenkarzinomen und in Leukämiezellen und im multiplen Myelom gefunden (de Villiers *et al.* 2002). Okamoto *et al.* (2001) untersuchten *post mortem* die Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher TTV-Genotypen im Serum und neun unterschiedlichen Geweben von drei Personen. Von einer Person wurde die amplifizierte TTV-DNA aus dem Serum und von neun Gewebetypen kloniert und von jeder der 10 Proben 30 Klone sequenziert. Ein Sequenzvergleich dieser 300 Klone wies sechs unterschiedliche Genotypen nach, von denen vier

neu waren. Der Gewebetropismus war stark ausgeprägt und die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Genotypen in unterschiedlichen Geweben sehr heterogen. Die genotypische Variabilität war hoch: In einem Gewebetyp/Serum traten bis zu fünf verschiedene Genotypen mit jeweils unterschiedlichen Häufigkeiten auf (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1:

Häufigkeitsverteilung von sechs verschiedenen TTV-Genotypen im Serum und neun unterschiedlichen Geweben einer *post mortem* untersuchten Person. Die ermittelten Häufigkeiten basierten auf der Auswertung von je 30 sequenzierten Klonen pro Gewebe und Serum (Darstellung leicht modifiziert nach Okamoto *et al.* 2001).

Probe	Häufigkeit verschiedener TTV-Genotypen					
	TYM9	SENV-F	SAa-10	Saj-30	SAJ-09	SAa-01
Serum	27 %	3 %	43 %	0 %	17 %	10 %
Knochenmark	23 %	---	37 %	---	37 %	3 %
Lymphknoten	100 %	---	---	---	---	---
Muskel	7 %	---	57 %	---	33 %	3 %
Schilddrüse	67 %	---	---	---	33 %	---
Lunge	83 %	---	3 %	---	13 %	---
Leber	63 %	---	3 %	---	33 %	---
Milz	50 %	---	47 %	3 %	---	---
Pankreas	---	3 %	93 %	---	---	3 %
Niere	53 %	---	---	3 %	43 %	---
Total	47 %	1 %	28 %	1 %	21 %	2 %

1.4 Transmission humaner Anelloviren

Die Übertragung von Anelloviren kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen parenteral durch Blut oder Blutprodukte. Dieser Transmissionsweg war bereits von Nishizawa *et al.* (1997) nachgewiesen worden. Folglich findet sich bei Empfängern von Blutprodukten eine deutlich erhöhte Prävalenz von TT-Viren (Lefrere *et al.* 2000, Simmonds *et al.* 1998, Okamoto *et al.* 1998a, Charlton *et al.* 1998, Akiba *et al.* 2005, Chiou *et al.* 2006, Borawski *et al.* 2006).

Allerdings käme laut Cao *et al.* (1999) auch eine perkutane Infektion durch verunreinigte Nadeln in Frage. Als alleiniger Übertragungsweg scheint dies aber angesichts der hohen Durchseuchungsrate als nicht wahrscheinlich.

Die fäkal-orale Übertragung ist ein weiterer Infektionsweg. TTV-Sequenzen wurden in Stuhlproben und Speichel, nicht aber in Urin nachgewiesen (Okamoto *et al.* 1998b, Ross *et al.* 1999, Davidson *et al.* 1999, Desai *et al.* 1999, Saback *et al.* 1999, Borawski *et al.* 2006). Experimentell konnte die Möglichkeit dieses Übertragungsweges durch die Auslösung einer TTV-Infektion bei Schimpansen mittels Übertragung von aus menschlichem Stuhl gewonnenen TT-Viren verifiziert werden (Tawara *et al.* 2000). Da TTV außerdem in Abwässern gefunden wurde, ist eine Infektion auch über diesen Weg denkbar. (Vaidya *et al.* 2002).

Eine maternale Übertragung von der Mutter auf das Kind scheint ebenfalls möglich zu sein (Gerner *et al.* 2000, Schröter *et al.* 2000, Goto *et al.* 2000, Matsubara *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 2001b, Springfield *et al.* 2000, Pirovano *et al.* 2002). Eine sexuelle Übertragung erscheint ebenfalls als sehr wahrscheinlich, weil TTV in Sperma und Speichel nachgewiesen wurde (Puig-Basagoiti *et al.* 2000, Inami *et al.* 2000).

Nicht zu vernachlässigen ist auch die hohe TTV-Durchseuchung bei Haustieren (Leary *et al.* 1999a). TTV kann also auch als Zoonose auftreten, wenn man Haustiere bzw. Nutztiere als mögliche Infektionsquelle berücksichtigt. Bereits im Jahr 2000 beschrieben Okamoto *et al.* (2000c) zoonotische Infektionen bei Affen.

1.5 Prävalenz humaner TT-Viren

Die Durchseuchungsrate mit TT-Viren ist weltweit sehr hoch, doch unterscheiden sich die in den Studien angegebenen Prävalenzen sehr deutlich. Dies kann auf unterschiedliche Untersuchungsmethoden zurückzuführen sein, wobei die Wahl der PCR-Primer und der zu amplifizierenden Genomregion aufgrund der hohen Sequenzdiversität eine entscheidende Rolle spielt (Itoh *et*

al. 1999). Untersuchungen der Seren von Patienten mit einem erhöhten Risiko für die parenterale Übertragung von Viren (Hämophilie, Hämodialyse, Personen mit intravenösem Drogenkonsum) ermittelten Prävalenzen für TTV von 1 % bis zu > 90 % (Okamoto *et al.* 1998a, Gerner *et al.* 2000a, Schröter *et al.* 2000, Viazov *et al.* 1998, Prescott *et al.* 1998, Takahashi *et al.* 1998, Niel *et al.* 1999). Für japanische Blutspender konnte eine über 90%ige Durchseuchung nachgewiesen werden (Takahashi *et al.* 1998, Okamoto *et al.* 1999b, Okamoto *et al.* 2000d). Diese starken Schwankungen der Prävalenzraten lassen sich auf die Wahl der Primer bzw. der amplifizierten Genomregion zurückführen. Anfänglich wurde die N22-Region aus dem offenen Leserahmen 1 für den Virusnachweis mittels PCR verwendet, wobei diese Primern nur die TTV-Genotypen 1-6 amplifizieren. Nach Identifikation der nicht kodierenden Region wurden Primer aus dieser Region verwendet, die es ermöglichten, einen Großteil der bekannten Genotypen zu identifizieren (Itoh *et al.*, 1999; Leary *et al.*, 1999a; Leary *et al.*, 1999b). Eine Übersicht über die Prävalenz von TTV in der Bevölkerung verschiedener Länder unter Verwendung von Primern aus zwei unterschiedlichen Genomregionen zeigt Tabelle 2.

Die Prävalenz der SEN-Viren, die der TTV-Hauptgruppe 3 angehören, unterlag aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Primerpaare für die Detektion ebenfalls großen Schwankungen, aber insgesamt war die Durchseuchung in den verschiedenen geographischen Regionen ebenfalls sehr hoch (Tabelle 3).

Selbst bei Haustieren konnten TTV-spezifische Isolate identifiziert werden. So wurden bei 19 % der untersuchten Hühner, 20 % der Schweine und 30 % der Schafe entsprechende Viren nachgewiesen (Nishizawa *et al.* 1999, Leary *et al.* 1999a).

Tabelle 2:

TTV-Prävalenz in der Bevölkerung verschiedener geographischer Regionen.

Geografische Region/Land		% positiv ORF1 PCR	% positiv UTR PCR
Afrika ¹	Kongo	43-44	---
	Ägypten	29	85
	Gambia	86	---
	Nigeria	52	---
	Sudan	7	2
Asien ²	China	5 - 11	---
	Japan	10 - 58	70-93
	Korea	14	---
	Mongolei	43	---
	Myanmar	---	96
	Nepal	---	82
	Pakistan	16	---
	Saudi Arabien	19	---
	Singapur	---	98
	Taiwan	10 - 53	---
	Thailand	7 - 36	---
Europa ³	Finnland	17	73
	Frankreich	5	---
	Deutschland	7 - 14	---
	Italien	9 - 50	---
	Spanien	14	---
	Niederlande	---	72
	Großbritannien	2 - 10	47-57
Nordamerika ⁴	USA	1 - 11	---
Ozeanien ⁵	Papua Neuguinea	75	---
Südamerika ⁶	Bolivien	---	82
	Brasilien	20 - 62	---
	Kolumbien	16	---
	Ecuador	71	---

¹: Prescott *et al.* 1998, Abe *et al.* 1999, Stark *et al.* 2000

²: Tsuda *et al.* 1999, Sugiyama *et al.* 2001, Nakano *et al.* 1999, Kato *et al.* 1999, Abe *et al.* 1999, Prescott *et al.* 1999, Simmons *et al.* 1998

³: Simmonds *et al.* 1998, Biagini *et al.* 1998, Berg *et al.* 1999, Maggi *et al.* 1999, Gimenez-Barcons *et al.* 1999, Prescott *et al.* 1998

⁴: Desai *et al.* 1999

^{5,6}: Abe *et al.* 1999, Prescott *et al.* 1999, Tanaka *et al.* 1999, Niel *et al.* 1999

Tabelle 3:
Weltweite SENV-Prävalenzen

Land	SENV positiv (%)	Quelle
Taiwan	28	Wang <i>et al.</i> 2007 (ORF 1 PCR)
China	31	Mu <i>et al.</i> 2004 (ORF 1 PCR)
Japan	10 – 20	Shibata <i>et al.</i> 2001, Umemura <i>et al.</i> 2000 (ORF 1 PCR)
USA, Italien	2	Mushawar <i>et al.</i> 2000, Bowden <i>et al.</i> 2001 (ORF 1 PCR)
Slowakei	24	Schreter <i>et al.</i> 2006 (ORF 1 PCR)
Türkei	25	Serin <i>et al.</i> 2006 (ORF 1 PCR)
Deutschland	1 – 17	Schröter <i>et al.</i> 2002 (ORF 1 PCR)
Ägypten	20	Mohammed <i>et al.</i> 2011 (ORF 1 PCR)

1.6 Klinik und Pathogenese humaner Anelloviren

Die Frage nach der Pathogenität des TT-Virus wird seit seiner Entdeckung kontrovers diskutiert. Da man das Virus zuerst bei einem Patienten mit Hepatitis isolierte, lag die Vermutung nahe, es könne Hepatitiden verursachen. Takahashi *et al.* (1998) beobachteten ein gehäuftes Auftreten von TTV bei Patienten mit Hepatitiden im Vergleich zu gesunden Blutspendern. Shibata *et al.* (2001) vermuteten ebenfalls, dass der Genotyp 1 eine Rolle in der Entstehung von fulminanten Non-A, -B und -C Hepatitis habe und zwar aufgrund der Tatsache, dass in ihrem Patientengut die Anzahl der TTV-positiven Personen signifikant höher war als in der Gruppe, in der die Hepatitis milder verlief. Studien von Bando *et al.* (2001) zeigten ebenfalls, dass der TTV-Genotyp 1 eventuell aggressiver ist als die anderen Genotypen. Doch gibt es auch gegenteilige Studien, die darauf hinweisen, dass dieser TTV-Genotyp nicht in Zusammenhang mit Leberwerterhöhung oder irgendeiner anderen Form der Hepatitis gebracht werden kann (Hijikata *et al.* 1999, Hsieh *et al.* 1999, Naoumov *et al.* 1998). Eventuell spielt TTV jedoch eine Rolle im Verlauf einer Leberzirrhose bei chronischer Hepatitis-C-Infektion. Mit Hepatitis C und TTV koinfizierte Patienten haben möglicherweise ein höheres Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln, da TTV die Rate irregulärer Regeneration

erhöhen kann (Moriyama *et al.* 2001). Das TT-Virus kann somit nicht als Hepatitis-Virus bezeichnet werden.

Eine weitere Hypothese ist, dass TTV pulmonale Erkrankungen hervorruft. Die TTV-Replikation wurde in Lungengewebe nachgewiesen, ebenso wie Koinfektion von TTV und Rhinitis bei Neugeborenen (Biagini *et al.* 2003). Bei Patienten, die mit akuten pulmonalen Erkrankungen stationär eingewiesen worden waren, wurden erhöhte TTV-Titer festgestellt (Maggi *et al.* 2003).

Ein Einfluss auf den Verlauf der idiopathischen Lungenfibrose und die Komplikation des Bronchialkarzinoms ist ebenfalls denkbar, da bei TTV-positiven Patienten eine höhere Laktatdehydrogenase und eine niedrigere 3-Jahres-Überlebensrate aufgezeigt wurde. (Bando *et al.* 2008).

Auch auf hämatologische Erkrankungen scheint TTV einen Einfluss zu haben. Patienten mit hoher TT-Viruslast im Knochenmark hatten eine höhere Prävalenz von durch Hepatitis verursachter aplastischer Anämie unklarer Ätiologie (Kikuchi *et al.* 2000). Andere Studien halten diesen Zusammenhang allerdings für unwahrscheinlich (Poovorawan *et al.* 2001, Safadi *et al.* 2001).

Auch ein Zusammenhang zwischen TTV und Lymphomen wird diskutiert (Garbuglia *et al.* 2003). In vielen Fällen wurde eine im Vergleich zu Gesunden erhöhte Viruslast gefunden (de Villiers *et al.* 2002).

Eine Koinfektion von TTV Genotyp 1 und humanem Papillomavirus war mit einem schlechteren Ausgang beim Larynxkarzinom assoziiert (Szladek *et al.* 2005). Laut Girard *et al.* (2007) könnte TTV zusammen mit einer HHV-8-Koinfektion eine Rolle bei der Entstehung des Kaposi-Sarkoms spielen.

Die hohe Mutationsrate ermöglicht es dem Virus, vom Immunsystem des Wirtes unentdeckt zu bleiben. In der hypervariablen Region im ORF1 finden häufig Mutationseignisse mit anschließendem Aminosäureaustausch statt. Somit ist das Virus vor im Blut zirkulierenden Antikörpern geschützt und persistiert im Kreislauf des Wirtes. Die hohe Prävalenz bei Gesunden spricht dafür, dass TTV ein apathogener, ubiquitär vorkommender Kommensale des Menschen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keinen definitiven kausalen Zusammenhang zwischen einer TTV-Infektion und einer davon hervorgerufenen Erkrankung ohne begleitende Grunderkrankung gibt. Es ist allerdings möglich, dass in einer speziellen Konstellation und zusammen mit anderen Erregern eine entsprechende Erkrankung ausgelöst beziehungsweise deren Verlauf verschlechtert werden kann.

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde die Transmission der humanen Anelloviren anhand eines Patientenkollektivs aus einer Ambulanz für sexuell übertragbare Krankheiten in Lagos (Nigeria) untersucht. Dazu sollte zunächst eine PCR etabliert werden, die es ermöglicht, die verschiedenen TTV-Genotypen umfassend zu detektieren. Zusätzlich sollte ein weiterer PCR-basierender Genomnachweis speziell für SEN-Viren entwickelt werden, die mit ihren verschiedenen Genotypen die TTV Hauptgruppe 3 darstellen.

Die Prävalenzdaten der Patienten mit Mehrfachinfektionen mit HIV, Hepatitis B und Hepatitis C sollten mit entsprechenden veröffentlichten Daten verglichen und interpretiert werden.

Darüberhinaus wurde ein auf Peptiden basierender ELISA zum Nachweis von TTV-spezifischen Antikörpern etabliert und die Ergebnisse mit denen der PCR verglichen werden.

Da humane Anelloviren auch in Nutztieren nachweisbar sind, wurde in einem zweiten Teil der Arbeit die Durchseuchung von Rindern und Schweinen in Süddeutschland mit TTV und speziell mit den Isolaten der Hauptgruppe 3 (SENV) untersucht werden, um Indizien für eine eventuelle fäkal-orale Übertragung zu erhalten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Humanes und tierisches Probenmaterial

Es wurden 50 Seren von 36 Männern und 14 Frauen aus einer Ambulanz für Haut und Geschlechtskrankheiten in Nigeria untersucht, die im Zeitraum von März bis Mai 1986 von Dr. Andreas Weimer in Lagos gesammelt worden waren (vgl. Tabelle 4).

Für den Nachweis von humanen Anelloviren im Blut von Nutztieren wurden 50 Schweine- und Rinderseren aus dem Jahr 2005 analysiert, die Frau Dr. Isar vom staatlichen tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf in Baden-Württemberg zur Verfügung gestellt hatte. Im Unterschied zu den humanen Proben wurden von den Tieren keine weitere Daten erhoben; daher wird hier auf eine tabellarische Auflistung der fortlaufend durchnummerierten Seren (Schweine: S1- 50; Rinder: R1-50) verzichtet.

Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Feinchemikalien

Die laborüblichen Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen mit und ohne Filter, Reaktionsgefäße, Petrischalen, Laborhandschuhe etc.) wurden von den Firmen Biozym, Eppendorf, Greiner, Falcon, Kimberly-Clark, Ansell und Sarstedt bezogen.

Soweit nicht anders vermerkt und versuchsrelevant stammten alle üblichen Laborchemikalien von den Firmen Merck, Serva, Sigma und Qiagen. TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA) für die DNA-Proben und TAE-Puffer (400 mM TRIS Acetat/10 mM EDTA) für die Gelelektrophoresen wurden von Roche bezogen. Die Feinchemikalien stammten von Bioline (Agarose) und Invitrogen (Nährmedien).

Tabelle 4:

Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Seren von 50 Personen (36 Männer, 14 Frauen), die 1986 in einer Ambulanz für Haut und Geschlechtskrankheiten in Nigeria gesammelt worden waren. (n.b. = nicht bekannt).

	Serum	Alter	Diagnose
MÄNNER	20	20	Gonorrhoe
	94	36	Urethritis
	95	n.b.	Lues
	115	20	Gonorrhoe
	127	26	Lues
	135	24	Herpes genitalis
	138	36	Gonorrhoe
	142	32	Urethritis
	143	22	Gonorrhoe
	145	24	Urethritis
	174	n.b.	Urethritis
	175	25	Ulcus molle
	180	32	Lues
	194	23	Gonorrhoe
	195	28	Gonorrhoe
	196	34	Urethritis
	197	23	Urethritis
	199	26	Herpes genitalis
	201	33	Urethritis
	215	55	Lues
	221	29	Urethritis
	225	24	Urethritis
	232	n.b.	Lues
	250	n.b.	Urethritis
	279	23	Gonorrhoe
	283	24	Genitale Candidiasis
	285	26	Lues
	286	22	Unbekannt
	293	n.b.	Urethritis
	299	45	Unbekannt
	312	32	Lues
	352	24	Gonorrhoe
	416	22	Lues
	447	16	Urethritis
	672	45	Urethritis
	693	39	Unbekannt
FRAUEN	104	23	Vaginitis
	114	25	Trichomoniasis
	116	20	Vaginitis
	129	n.b.	Genitale Candidiasis
	139	25	Gonorrhoe
	164	33	Lues
	177	30	Lues
	200	21	Herpes genitalis
	220	20	Genitale Candidiasis
	234	30	Genitale Candidiasis
	240	40	Cystitis
	296	21	Gonorrhoe
	336	28	Vaginitis
	446	28	Genitale Candidiasis

Verwendete Kits

FastPlasmid Mini Kit	Eppendorf
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen

Biochemikalien

Ampicillin	Carl Roth
DNA Marker 1 kbp (Größenstandard)	Invitrogen
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β-D-galactopyranosid)	PeqLaB
dNTP (Nukleotide für die PCR)	Promega
Gelladepuffer (40 % Saccharose, 0,05 % Bromphenolblau, 0, % SDS 1 mM EDTA)	Invitrogen
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma

Enzyme

Advantage Taq-Polymerase incl. Puffer und MgCl ₂	Clontech
Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	Roche

Antikörper und Peptide

Kaninchen anti-Human IgG Antikörper, Peroxidase markiert Dako

Zum Nachweis der Anellovirus-spezifischen Antikörper standen vier Peptide zur Verfügung, die freundlicherweise von Dr. Hubert Kalbauer, Naturwissenschaftlich-medizinisches Institut der Universität Tübingen, synthetisiert worden waren.

Die vier Peptide hatten folgende Sequenzen:

Peptid 14: PRMAWWGRWRPWRWRRRRWRGRRRRRLRTRRARRPLRRRG

Peptid 16: EYHLGWYSNIFIGNLRHNLAFRPAYIDVTYNPIV

Peptid 17: TGPFSYRDEHPSVTLTAKYKFYFNWGGDSI

Peptid 19: RRGTRRVRRRRWGRRRWRRGYRRRLRLRRKRRRRKKIVL

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktionen

Extraktion viraler DNA

Die virale DNA wurde entweder mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit oder mit dem QiAmp DNA Mini Kit von Qiagen isoliert. Das Extraktionsprinzip dieser Kits beruht auf der Bindung der Nukleinsäure an einer Silikagel-Oberfläche in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen von Guanidinhydrochlorid. Die Isolierung der DNA erfolgte gemäß der Angaben in der Anleitung der Kits. Bis zur Verwendung für die PCR wurden die DNAs bei -20°C gelagert.

Isolierung der Plasmid-DNA von transformierten Bakterien (*Escherichia coli*)

Die Plasmid DNA der Klone wurden mit dem Plasmid Mini Kit von Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert

2.2.2 Virusnachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle im folgenden beschriebenen PCR-Versuche wurden entweder im Hybaid Omn-E Thermal Cycler der Firma MWG Biotech oder im DNA Cycler Cetus von Perkin Elmer durchgeführt.

Aufgrund der außerordentlichen Empfindlichkeit der PCR-Methode und der damit einhergehenden Anfälligkeit für Kontaminationen wurden die DNA-Extraktion, die Amplifikation und anschließende Detektion der PCR-Produkte auf Agarosegelen räumlich voneinander getrennt durchgeführt.

Für den Nachweis der TT- und der SEN-Viren wurden die in Kapitel 2.1 angegebenen Primer verwendet.

Reaktionsansatz für die TTV- und SENV-PCR:

- 33 µL H₂O
- 5 µL Puffer
- 2 µL Primer sense
- 2 µL Primer antisense
- 2 µL dNTPs
- 1 µL Advantage Taq-Polymerase

Der Reaktionsmix wurde zum Schutz gegen Verdunstung mit 2 Tropfen Parafinöl überschichtet. Erst danach wurden 5 µL Virus-DNA in die wässrige Phase hinzupipettiert (Endvolumen: 50 µL).

Amplifikationsbedingungen

TTV-Nachweis:

Denaturierung	94°C	1 min	1 x
Denaturierung	94°C	30 sec	} 35 x
Annealing	55°C	30 sec	
Synthese	68°C	30 sec	
Synthese	72°C	10 min	1 x

SENV-Nachweis:

Denaturierung	94°C	1 min	1 x
Denaturierung	94°C	30 sec	} 35 x
Annealing	55°C	30 sec	
Synthese	68°C	30 sec	
Synthese	72°C	10 min	1 x

Nested PCR

Falls die in einem Reaktionsansatz eingesetzte DNA Menge so gering war, dass im Agarosegel keine DNA sichtbar war, wurde eine zweite PCR mit den sogenannten nested Primern (Set B for-2 sense, Set B rev-2 antisense) durchgeführt, deren Bindungstellen innerhalb des vom ersten Primerpaar amplifizierten Abschnittes liegen. Damit wird die Sensitivität und Spezifität des Nachweises erhöht.

Die nested PCR wurde nur für Proben durchgeführt, bei denen nach der ersten PCR kein Amplifikat detektiert werden konnte. Für den nested PCR-Ansatz wurde jeweils 1 µL (= 1/50 Vol) des PCR-Produktes aus der ersten PCR als Template eingesetzt.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Detektion der PCR-Produkte und Auftrennung der mit *EcoRI* geschnittenen Plasmid-DNA verwendet. Es wurden 2%ige Agarosegele mit Ethidiumbromid hergestellt und TAE verwendet und jeweils 1/5 Vol (= 10 µL) des PCR-Ansatzes aufgetragen. Die Auftrennung

erfolgte mit 100 V für ca. 30 min bis der Farbstoff des Ladepuffers (Bromphenolblau) ca. 2/3 der Gellänge durchlaufen hatte. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden auf jedem Gel eine 1 kb-Leiter als Molekulargewichtsstandards aufgetragen. Die Gele wurden unter UV-Licht (302 nm) mit einer Polaroidkamera fotografiert.

2.2.4 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Um einige ausgewählte SENV-PCR-Produkte zu sequenzieren, wurden sie zunächst kloniert. Dazu wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Sowohl die Klonierung als auch die anschließende Transformation und das Screening der positiven Klone mittels Restriktionsspaltung mit *EcoRI* wurden ohne Modifikation nach den Angaben im Handbuch des Herstellers durchgeführt.

Es wurden neun humane SENV-Isolate der nigerianischen Patienten sowie drei Virusisolate aus Rinden und zwei aus Schweinen von einem kommerziellen Anbieter (4base lab, Reutlingen) sequenziert.

2.2.5 Nachweis von SEN-Virus spezifischen Antikörpern mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zunächst wurden die Mikrotiterplatten mit dem SENV-spezifischen Peptid beschichtet. Dazu wurde je 1 µg des Peptids mit 100 µL Bicarbonatpuffer (10 mM NaHCO₃) verdünnt und von dieser Lösung jeweils 100 µL/Kavität pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag 5-mal mit TBST-Puffer gewaschen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Durchführung

1. Die Seren wurden mit TBST 1 : 500 verdünnt und jeweils 100 µL/Kavität pipettiert; als Leerwert diente TBST-Puffer.
2. Die Microtiterplatten wurden zum Schutz vor Verdunstung mit Parafilm abgeklebt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

3. Die Seren wurden abgesaugt und die Platte 5-mal mit jeweils 250 μL TBST pro Kavität gewaschen.
4. Zugabe von jeweils 100 μL Sekundär-Antikörper (Peroxidase-gekoppelte Kaninchen anti-Human IgG Antikörper), der 1 : 10.000 in TBST + 1% BSA verdünnt worden war. Inkubation für 1 h bei 37°C. Absaugen des Antikörpers und 5-maliges Waschen der Platte mit jeweils 250 μL TBST-Puffer.
5. Zugabe von 100 μL des chromogenen Substrates Tetramethylbenzidin (TMB), welches die mit den Sekundärantikörpern gekoppelte Meerrettichperoxidase umsetzt. Die Farbentwicklung ist nach 10 - 30 Minuten abgeschlossen und wurde in der Regel nach 15 min mit 50 μL 1 N H_2SO_4 gestoppt.
6. Die Proben wurden innerhalb von 15 min nach Abstoppen der Färbereaktion im Photometer bei der Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

3 ERGEBNISSE

Für diese Arbeit wurden 50 Serumproben von 36 Männern und 14 Frauen mit einem Altersdurchschnitt von 28 Jahren auf das Vorhandensein von TTV und einer eventuellen Korrelation mit dem Auftreten von Geschlechtskrankheiten untersucht. Darüber hinaus wurden im Hinblick auf die Möglichkeit zoonotischer Infektionen auch je 50 Rinder- und Schweineseren untersucht.

3.1 Nachweis von TTV und SENV in Seren nigerianischer Patienten

Um eine möglichst große Anzahl der vielen TTV-Genotypen mit einem PCR-Assay erfassen zu können, wurden nicht die Primer aus der konservierten kodierenden Region N22 verwendet (Okamoto *et al.* 2001, Biagini *et al.* 2001) sondern Primer, die eine nicht kodierende Region amplifizierten. Abbildung 8 zeigt die Gelelektrophorese von Proben, die in der ersten PCR-Runde kein oder zumindest kein auf einem Agarosegel nachweisbares Produkt erbrachten und daher anschließend nochmals mit dem zweiten Primerpaar für die nested PCR amplifiziert wurden.

Abbildung 9 zeigt die Auftrennung der SENV-Amplifikate im Agarosegel. Für den Nachweis von SENV wurde keine nested PCR durchgeführt; die Primerbindungsstellen lagen im ORF1.

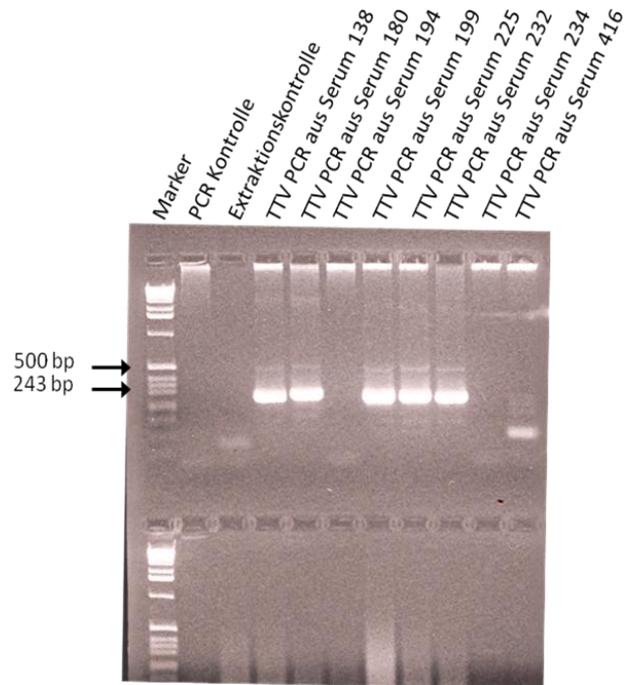


Abbildung 8:

Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der TTV-PCR. Untere Gelhälfte: 1. Runde der PCR: keine Amplifikate nachweisbar. Obere Gelhälfte: 2. Runde der PCR: PCR-Produkte in einigen Spuren sichtbar. Spur 1: 1 kbp Marker; Spur 2: PCR-Negativkontrolle (H₂O); Spur 3: Extraktionsnegativkontrolle (H₂O); Spuren 4, 5, 7, 9: PCR-Produkte (Länge: 243 bp) der jeweils aufgeführten Seren; Spuren 6 und 10: keine Amplifikate; Spur 11: Unspezifische Amplifikation.

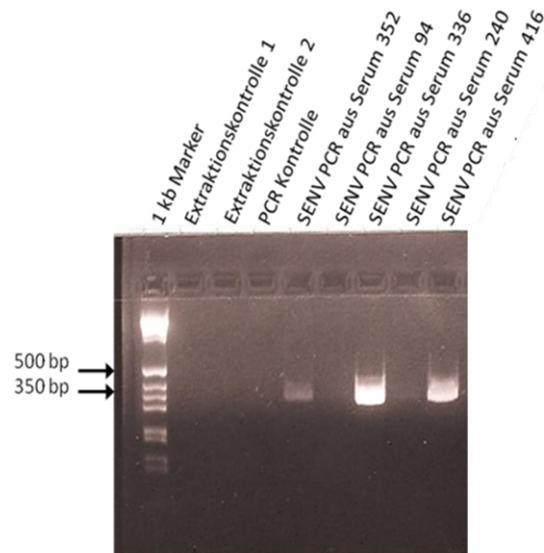


Abbildung 9:

Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der SENV-PCR. Spur 1: 1 kbp Marker; Spuren 2 und 3: Extraktionsnegativkontrolle (H₂O); Spur 4: PCR-Negativkontrolle (H₂O); Spuren 5, 7, 9: PCR-Produkte (Länge 350 bp) der jeweils aufgeführten Seren; Spuren 6 und 8: keine Amplifikate nachweisbar.

3.2 Prävalenz des TT-Virus und eine mögliche Korrelation mit dem Auftreten von Geschlechtskrankheiten

Von den insgesamt 50 getesteten Seren waren 32 (64 %) positiv für SENV, der 3. Hauptgruppe der TT-Viren, und 19 (38 %) waren positiv für andere TTV-Genotypen. Bei 16 (32%) Patienten konnten neben SENV auch noch andere TTV-Genotypen nachgewiesen werden. Tabelle 5 zeigt die Häufigkeit von TTV und dem SENV-Genotyp innerhalb der Studienpopulation und deren Korrelation mit weiblichem oder männlichem Geschlecht sowie mit Geschlechtskrankheiten. Bei *Ulcus molle* und *Cystitis* lag keine Infektion mit TTV oder SENV vor. Am häufigsten war die Urethritis mit einer TTV-Infektion vergesellschaftet. Im untersuchten Patientengut litten 13 der 35 Männer an dieser Erkrankung, jedoch keine Frau. An *Lues* waren insgesamt zwei Frauen und acht Männer erkrankt. Eine dieser beiden Frauen war gleichzeitig TTV-positiv jedoch gab es bei den Männern fünf für SENV und fünf für TTV positive.

Insgesamt gab es vier Doppelinfektionen mit TTV und dem SEN-Genotyp. Mit *Gonorrhoe*, einer ebenfalls sehr häufigen sexuell übertragbaren Erkrankung, ausgelöst durch den Erreger *Neisseria gonorrhoeae*, waren zwei Frauen und acht Männer infiziert. Es kommt durch diese Erkrankung zu Infektionen der äußeren und inneren Geschlechtsorgane bis hin zu Unfruchtbarkeit. Keine Frau wies eine TTV-Infektion auf wo hingegen zwei Männer für TTV und sechs speziell für SENV positiv waren. Keine Infektion mit TTV fanden sich bei der *Cystitis* und *Ulcus molle*. Der *Ulcus molle* ist eine in Europa sehr seltene sexuell übertragbare Erkrankung, welche typische Hautulcerationen und Lymphknotenschwellung hervorruft,. Nur ein männlicher Patient war daran erkrankt. An *Cystitis*, einer Entzündung der Harnblase, war eine weibliche Patientin erkrankt bei der keine TTV-Infektion nachgewiesen werden konnte. *Candidose* ist eine nicht ansteckende Pilzinfektion; an ihr litten vier Frauen und ein Mann. Bei *Trichomoniasis* und dem *Herpes genitalis* lagen 100 % und 66,6 % Doppelinfektionen vor, jedoch nur bei einem und drei erkrankten Patienten. Diese beiden Erkrankungen sind hochansteckend. Drei Männer hatten unbekannte Erkrankungen; sie waren alle positiv für SENV, nur einer von ihnen war für mit einem weiteren TTV-Genotyp infiziert.

Tabelle 5:

Häufigkeit von TTV Infektionen und Geschlechtskrankheiten innerhalb einer Studienpopulation von 50 nigerianischen Patienten (w = weiblich, m = männlich, Σ = Summe).

Krankheiten	Anzahl Patienten			TTV positiv Anzahl (%)			SENV Genotyp positiv Anzahl (%)			TTV u. SENV positiv Anzahl (%)		
	w	m	Σ	w	m	Σ (%)	w	m	Σ (%)	w	m	Σ (%)
	<i>Urethritis</i>	0	13	13	0	6	6 (46)	0	9	9 (69)	0	5
<i>Gonorrhoe</i>	2	8	10	0	2	2 (20)	0	6	6 (60)	0	2	2 (20)
<i>Cystitis</i>	1	0	1	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Lues</i>	2	8	10	1	5	6 (60)	0	5	5 (50)	0	4	4 (40)
<i>Vaginitis</i>	3	0	3	1	0	1 (33,3)	2	0	2 (66,6)	1	0	1 (33,3)
<i>Trichomoniasis</i>	1	0	1	1	0	1 (100)	1	0	1 (100)	1	0	1 (100)
<i>Genitale Candidose</i>	4	1	5	0	0	0 (0)	2	1	3 (60)	0	0	0 (0)
<i>Herpes genitalis</i>	1	2	3	0	2	2 (66,6)	1	2	3 (100)	0	2	2 (66,6)
<i>Ulcus molle</i>	0	1	1	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
Unbekannt	0	3	3	0	1	1 (33,3)	0	3	3 (100)	0	1	1 (33,3)
Gesamt	14	36	50	3	16	19 (38)	7	25	32 (64)	2	14	16 (32)

Altersangaben lagen nur von 44 der 50 Patienten vor. Tabelle 6 zeigt die Verteilung des Altersdurchschnitts in den für TTV und SENV positiven bzw. negativen Patientengruppen. Mit $p = 0,5$ war der Unterschied des durchschnittlichen Lebensalters zwischen den Gruppen der negativen bzw. positiven Patienten nicht signifikant.

Tabelle 6:

Durchschnittsalter der Patienten mit bzw. ohne Anellovirus-Infektion

Gesamte Population (N = 44)	Altersdurchschnitt (Jahre)			
	TTV positiv	TTV negativ	SENV positiv	SENV negativ
28	30	27	27	30

3.3 Sequenzen der SEN-Virus-Isolate der nigerianischen Seren

In dieser Arbeit wurde nur SENV sequenziert, weil es für dieses Virus im Vergleich zu anderen TTV-Genotypen weniger publizierte Daten über die Prävalenz und Genotypenvielfalt gibt. Daher wurden neun ausgewählte SENV-Amplifikate sequenziert, um die genetische Variabilität zu erfassen und ein entsprechendes Dendrogramm zu erstellen.

Im Folgenden sind die Sequenzen aufgeführt. Die Bezeichnung besteht aus dem Code für die Seren (die ersten drei Ziffern) und der Nummer des sequenzierten Klons.

>114-10

```
TACTCAAaCGACCAGCTAGACCTCGCCAGGTACTTTGGCTGCACCTTCTGGTTCTA
CAGACACCCAGAGGTGGACTTTGTAGCTCAGTTTGACAACGTTCCCCCATGAAA
ATGGACGAGAACACAGCTCCCAACACTCATCCCTCTTTCTTACTACAGAACAAACA
CAGGGTTAAAATCCCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTTAGAG
TCACAGTAGGGCCCCCAAACCTCYTTGAAGATAAGTGGTACAGCCAACATGACTT
GTGTAAGGTGCCCTAGTCAGTTGGCGGTTAACCGCAGCTGACTTCAGGTTTCCG
TTCTGCTCACCACAAAC
```

>138-6

```
TACCCCAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGATACTTTGGCTGCACCTTCTACTTCTA
CAGACACCCTGAAATTGACTTTGTAGCTCAGTATGACAACGTACCCCCCATGAAAA
TGGACGAAAACACAGCTCCCAACACTCACCCCTCTTTTTTACTACAAAACAAACGC
AAAGTTAAAATTCCCAGCTTTAAAACCTAAGCCATTTGGTAGAAAAAGAGTGAGAGT
CACAGTGGGGCCCCCAAACCTGTTTGAAGATAAATGGTACAGCCAGCATGACTTG
TGTAAGGTGCCCTAGTCAGTTGGCGGTTAACCGCATGTGACTTCAGATTTCCGT
TCTGCTCACCACAAAC
```

>174-9

TACTCCAACGACCAGCTAGACCTAGCCAGGTACAGGGGCTGTAAATTTAAACTAT
ACAGAGACACCAACACAGACTTTATAGTAACCTATGACATAAATCCACCCATGAAA
AACACAGAAGCTCAGCAGTCCCAACACGCACCCAGGCATGCTAATGCAGCAAAAAGA
GAAAGATACTGGTGCCAGCTGGGACACGTACCCCAGGGGCAGAAAATATGTCC
TGGTTAAGATAACACCCCCCAAAGCTGTTTGAAGACCACTGGTACACTCAGCCAGA
CTTGTGCAAAGTTCCTCTTGTAACTTTGCGGTCAACTGCCGCTGACCTCAAACATC
CGTTCTGCTCACCACAAAC

>195-9

TACCCCAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGGTACTTTGGCTGCACCTTCTGGTTCT
ACAGACACCCAGAGGTGGACTTTGTAGCTCAATTTGACAACGTTCCCCCATGAA
AATGGACGAGAACACAGCCCCAACACTTATCCCTCTTCTACTACAAAACAAAC
ACAGGGTTAAGATTCCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTCAGA
GTTACAGTAGGGCCCCCAAGCTGTTTGAAGATAAGTGGTACAGCCAGCATGACT
TGTGTAAGGTGCCCTAGTCAGTTGGCGGTTAACCGCAGCTGACTTCAGATTTCC
GTTCTGCTCACCACAAAC

>199-1

TACTCAAACGACCAGCTAGACCTAGTGAGATACAAACACGCCAGATTCAAGTTCTA
CAGAAGCAAAGACACTGACTTTATAGTTACCTTTAACATAAAGCCTCCTATGAAAAT
GAACGAGACTACCTCACCTAACGCACACCCCGGCATGCTCATGCAGATGAAACAT
AAAATACTCATTCCCAGCTTTCAGACAAGGCCAGGGGGGCGAAGATACGTGTCAG
TTAAAATAGGGCCCCCAAAGCTGTTTGAAGACAAGTGGTACCCACAGGCAGACTT
TTGCAAGGTTTCTTGTGTCAGTTTAACCGCAACCGCATGTGACTTCAGACATCCGT
TCTGCTCACCACAAAC

>221-3

TACTCAAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGGTACTTTGGCTGCACCTTCTGGTTCT
ACAGACACCCAGAGGTGGACTTTGTAGCTCAGTTTGACAACGTTCCCCCATGAA
AATGGACGAGAACACGGCCCCAATACTCATCCCTCTTCTTACTACAAAACAAAC
ACAGGGTTAAAATCCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTTAGA
GTTACAGTAGGGCCCCCAAAGCTGTTTGAAGATAAGTGGTACAGCCAGCATGACT
TGTGTAAGGTGCCCTAGTCAGTTGGCGGTTAACCGCAGCTGACTTCAGGTTTCC
GTTCTGCTCACCACAAAC

>279-1

TACTCCAACGACCAGCTAGACCTGGCCAGGTACAAGGGGCTGCAAATTTAGCTTCT
ACAGACACCAGGACACTGACTTTCATAGTGCAGTACGACACGGTTCCCTCCCATGCA
AATGGACGAGTACACTTCACCCAACACACACCCCGCATTTTCTTATGCAGGCTAAG
AAAAAGATAATAGTATACAGCTTCAAGACCAGGCCGGGGGGCAGAAAGAGGGTAA
CAGTTAGAGTAGCCCCCCTAAGTTGTTTGAAGACAAGTGGTACTCCAGCACGA
CTTGTGCAAGGTCCACCTTGTGTCAGTTGGAGAGCAACCGCATGCAACTTGCGGTTT
CCGTTCTGCTCACCACAAAC

>283-5

TACTCAAACGACCAGCTAGACCTGGCTAGGTACAAGGGGTGCAAATTCACATTTT
ACAGAAACAAATCCACTGACTTTATAGCCAGTATGACATAGTTGCTCCCTACGCG
CTAGACAAGAACAGCAGCCCCTTACGCCCGGGAATCATGATGCAGGCTAAAA
ACAAAATCCTGATTCCCAGCTACAACACTAAACCCAGGGGTGCGCAAAAAATTA
GTTAAAATACCACCCCCCAAAGCTTTTGTAGATAAGTGGTACTCGCAAGAGGACCT

GTGTTCCGTTAATCTTGTGTCACCTTGCGGTTTCTGCGGCTGACTTTGTACATCCGT
TCTGCTCACCACAAAC

>299-3

TACTCAAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGATACTTTCGGCTGCACCTTCTGGTTCT
ACAGACACCCAGAGGTGGACTTTGTAGCTCAGTTTGACAACGTTCTCCCATGAA
AATGGACGAGAACACAGCCCCCAACTCATCCCTCTTCTTACTACAGAACAAAC
ACAGGGTAAAATCCCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTCAGG
GTCACAGTGGGGCCCCCAAACGTGTTGAAGATAAGTGGTACAGCCAGCATGACT
TGTGTAAGGTGCCCTAGTCAGTTGGCGGTTAACCGCAGCTGACTTCAGGTTTCC
GTTCTGCTCACCACAAAC

Von diesen Sequenzen wurde unter Verwendung von CLUSTAL W (1.81) ein Alignment erstellt (vgl. Abbildung 11). Zu Vergleichszwecken wurden die in der Sequenzdatenbank GenBank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) publizierten acht Prototypsequenzen der Genotypen A bis H des SEN-Virus verwendet. Die zugehörigen Zugangsnummern in GenBank sind: SENV-A: AX025667, SENV-B: AX025677, SENV-C: AX025718, SENV-D: AX025730, SENV-E: AX025761, SENV-F: AX025822, SENV-G: AX025830, SENV-H: AX025838. Unterhalb des Alignments sind die polymorphen Nukleotidpositionen jeweils mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Primer SEN-A1F

SEN-A TTCCCAACGACCAGCTAGACCTGTGAGGTACAAACACACCAGGTTTAAATTTTACAGAG
199-1 TACTCAAACGACCAGCTAGACCTAGTGAGATACAAACACGCCAGATTCAAGTTCTACAGA
174-9 TACTCCAACGACCAGCTAGACCTAGCCAGGTACAGGGGCTGTAAATTTAAACTATACAGA
SEN-D TACCCAACGACCAGCTAGACCTAGCCAGATACAAAGGCTGTAAATTTAAATTTTACAGA
SEN-F TACCCAACGACCAGCTAGACCTTGCCAGATACAAGGGCTGCTCATTCAGACTGTACAGA
114-10 TACTCAAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGGTACTTTGGCTGCACCTTCTGGTTCTACAGA
221-3 TACTCAAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGGTACTTTGGCTGCACCTTCTGGTTCTACAGA
299-3 TACTCAAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGATACTTTCGGCTGCACCTTCTGGTTCTACAGA
195-9 TACCCAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGGTACTTTGGCTGCACCTTCTGGTTCTACAGA
SEN-H TACTCCAACGACCAACTAGACCTAGCCAGATACTTTGGCTGCACCTTCTGGTTCTACAGA
138-6 TACCCAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGATACTTTGGCTGCACCTTCTACTTCTACAGA
SEN-C TACCCAACGACCAGCTAGACCTGGCCAGATACAAGGGCTGCAAATTCATCTTCTACAGA
279-1 TACTCCAACGACCAGCTAGACCTGGCCAGGTACAAGGGCTGCAAATTTAGCTTCTACAGA
SEN-G TACTCAAACGAACAGCTAGACCTGGCTAGATACAGAGGATGTACCCTAAAGGTGTACAGA
SEN-B TTCTCAAACGACCAGCTAGACCTGGCCAGATACAGAGGCTACAAATTCAGGTTCTACAGA
283-5 TACTCAAACGACCAGCTAGACCTGGCTAGGTACAAGGGGTGCAAATTCACATTTTACAGA
SEN-E TTCCCAATGATCAGCTAGACCTGGCCCCGATACAAGGGGTGCAAATTCACCTTTTACAGA
* *

Fortsetzung Abbildung 10:

SEN-A AGCAAAGACACTGACTTTTATAGTTACCTTTAACATAAAAGCCTCCCATGAAAAATGAACGAG
 199-1 AGCAAAGACACTGACTTTTATAGTTACCTTTAACATAAAAGCCTCCCATGAAAAATGAACGAG
 174-9 GACACCAACACAGACTTTTATAGTAACTTATGACATAAAATCCACCCATGAAAAACACAGAA
 SEN-D GACACAAAACACAGACTTTTATAGTCACCTATGACATAAAATCCACCCATGAAAAACACAGAA
 SEN-F CACCCCACTGACTTTTATACTGCAATATGACAACAATCCTCCCATGAAAAACTATA
 114-10 CACCCAGAGGTGGACTTTGTAGCTCAGTTTGACAACGTTCCCCCATGAAAAATGGACGAG
 221-3 CACCCAGAGGTGGACTTTGTAGCTCAGTTTGACAACGTTCCCCCATGAAAAATGGACGAG
 299-3 CACCCAGAGGTGGACTTTGTAGCTCAGTTTGACAACGTTCCCCCATGAAAAATGGACGAG
 195-9 CACCCAGAGGTGGACTTTGTAGCTCAATTTGACAACGTTCCCCCATGAAAAATGGACGAG
 SEN-H CACCCAGAGGTGGATTTTGTAGCTCAATTTGACAACGTTCCCCCAATGAAAAATGGACGAG
 138-6 CACCCTGAAATGACTTTTGTAGCTCAGTATGACAACGTACCCCCCATGAAAAATGGACGAA
 SEN-C CACCCAGAGACAGACTTTTGTAGTTCAGTATGACAATGTTCCCCCATGAAAAATGGATGAG
 279-1 CACCAGGACACTGACTTTCATAGTGCAGTACGACACGGTTCCTCCCATGCAAAATGGACGAG
 SEN-G CAGCAAAAAGTAGACTTTATAATGACATTCACACCATCCCTCCAATGCAAAATGAACGAA
 SEN-B CACCCACCTGTGACTTTATAATACACTACAACCTAATTCCTCCTCAAAAATAAACAG
 283-5 AACAAAATCCACTGACTTTATAGCCCAGTATGACATAGTTGCTCCCTACGCGCTAGACAAG
 SEN-E AACAAAATGACTGACTTTATAGCCCAGTATGACATAGTTGCTCCCTACGCACTAGACAGG
 ***** * ** ***** ** ***** * *****

SEN-A ACTACCTCACCGAACGCGCACCCCGGGCATGCTAATGCAGATGAAACACAAAATACTCGTG
 199-1 ACTACCTCACCTAACGCACACCCCGGGCATGCTCATGCAGATGAAACATAAAAATACTCATT
 174-9 CTCAGCAGTCCCAACACGCACCCAGGCATGCTAATGCAGCAAAAAGAGAAAGATACTGGTG
 SEN-D CTAAGCAGCCCTAACACTCATCCAGGCATGCTTATGCAGCAAAAAGAAAGATACTCGTC
 SEN-F CTTAGCTCTCCAAACACGCACCCAGGCATGTTAATGCAACAGAGACACAAAATACTTGTC
 114-10 AACACAGCTCCCAACACTCATCCCTCTTCTTACTACAGAACAACACAGGGTTAAAATC
 221-3 AACACGGCCCCCAATACTCATCCCTCTTCTTACTACAAAACAACACAGGGTTAAAATC
 299-3 AACACAGCCCCCAACACTCATCCCTCTTCTTACTACAGAACAACACAGGGTTAAAATC
 195-9 AACACAGCCCCCAACACTTATCCCTCTTCTTACTACAAAACAACACAGGGTTAAGATT
 SEN-H AACACAGCCCCCTAACACTCACCCATCATTTCTACTACAAAACAACACAGGGTTAAAATC
 138-6 AACACAGCTCCCAACACTCACCCCTCTTTTTTACTACAAAACAACAGCAAGTTAAAATT
 SEN-C TTTACAGCCCCCTAACACTCATCCCAGCTTGCTGCTACAGGCCAAACACAGACGCAAAATC
 279-1 TACACTTACCCAACACACACCCCGCATTTCTTATGCAGGCTAAGAAAAGATAAATAGTA
 SEN-B CTGACAGCTCCAAATACACACCCGGGCATGCTAATGATACAAAAGATGAAAATTCTAATA
 SEN-G AACACAGCCCCCTTACGCCCCGGGAATCATGATGCAGGCTAAAAACAAGATAAATAATA
 283-5 AACACAGCCCCCTTACGCCCCGGGAATCATGATGCAGGCTAAAAACAAGATAAATAATA
 SEN-E AACACAGCCCCCTTACGCCCCGGGAATCATGATGCAGGCTAAAAACAAGATAAATAATA
 *** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *

SEN-A CCCAGCTTTCAAACCTAGACCCGGGGGGCGCAGATACGTGTCTGTAAAGATAGGGCCCCC
 199-1 CCCAGCTTTCAGACAAGGCCAGGGGGGCGAAGATACGTGTCTAGTTAAAATAGGGCCCCC
 174-9 CCCAGCTGGGACACGTATCCCAGAGGCAGAAAATATGTCTAGCTAAAATACCACCCCC
 SEN-D CCTAGCTGGGACACGTATCCCAGAGGCAGAAAATATGTCTAGCTAAAATACCACCCCC
 SEN-F CCTAGCTGGCAAACCTTACCCAGGGGTAGAAAATACGTAAAGTAAAGATACCCCACT
 114-10 CCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTTAGAGTACAGTAGGGCCCCC
 221-3 CCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTTAGAGTTACAGTAGGGCCCCC
 299-3 CCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTACAGGTCACAGTAGGGCCCCC
 195-9 CCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTACAGGTTACAGTAGGGCCCCC
 SEN-H CCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGCAGAAAAAAGTTAGAGTAAAGTGGGGCCCCCG
 138-6 CCCAGCTTTAAAACCAAGCCTTTTGGTAAAAAGGAGTGAGAGTACAGTAGGGCCCCC
 SEN-C CCCAGTTTAAAACCAAGCCTTTTGGTAAAAAGGAGTTCGCCATTAGAGTGGGGCTCCT
 279-1 TACAGCTTCAAGACCAGGCCGGGGGGCAGAAAAGAGGTAACAGTTAGAGTAGCCCCCT
 SEN-G CCTAGCTTTGAAACCAAGGCCAGGGGGCAGAAAATACAAAAGAGTTAAAATACCCCCCA
 SEN-B CCCAGCTTCAACACTAAAACCCAGGGGTGCGCAAAAAATTTACTGTTAAAATACCACCCCC
 283-5 CCCAGCTTCAACACTAAAACCCAGGGGTGCGCAAAAAATTTACTGTTAAAATACCACCCCC
 SEN-E CCCAGCTTCAACACTAGACCCAGGGGTGCGCAAAAAATTTAGTGTAAAATACCACCCCC
 *** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** *

weiterer SEN-positiver Seren von Patienten aus der Ambulanz für Geschlechtskrankheiten in Nigeria ermittelt. Es ist zu erkennen, dass die SEN-Sequenzen 138-6, 195-9, 299-3, 114-10 und 221-3 sowie die zwei weiteren Sequenzen von Frau Dr. Schleicher (96-1, 91-2) mit SENV-H das größte aller Cluster bilden.

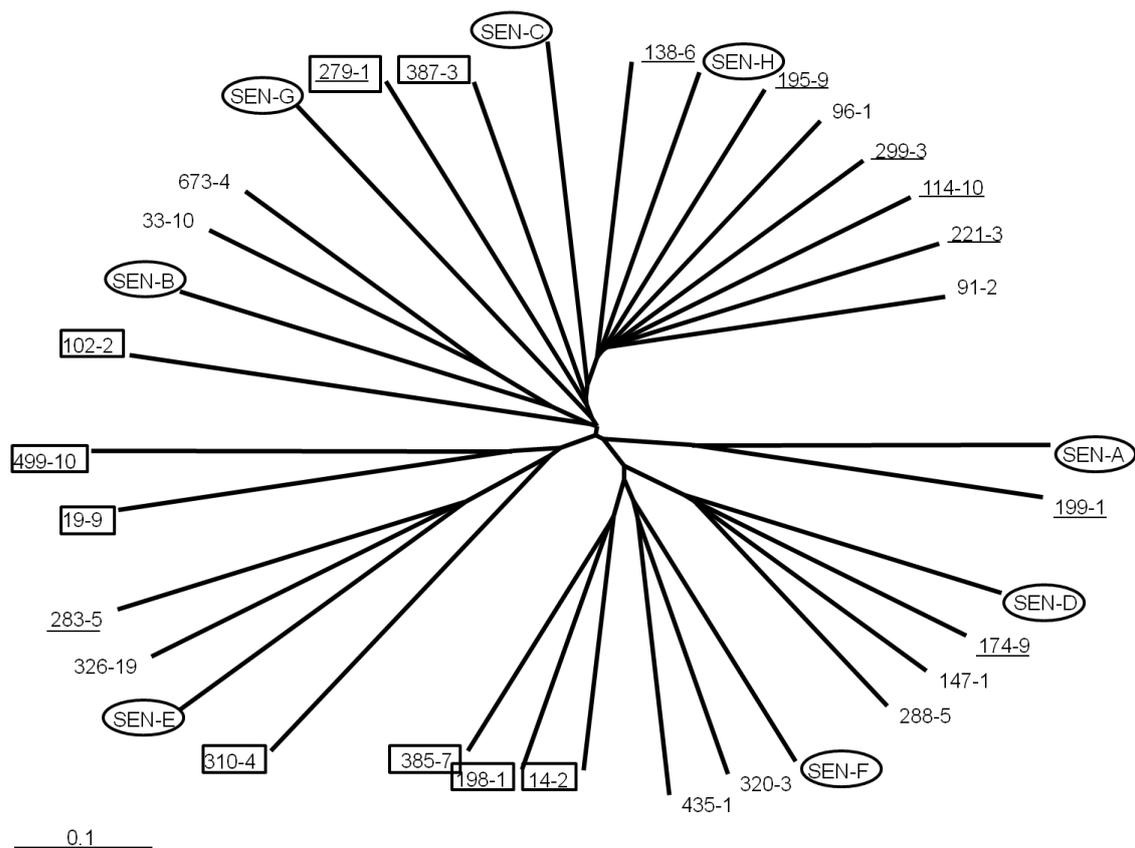


Abbildung 11:

Dendrogramm von SENV A-H und 26 sequenzierten SENV-Amplifikationen. Die Sequenzen aus der vorliegenden Arbeit sind unterstrichen; nicht unterstrichene Proben waren von Frau Dr. Schleicher (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt worden. Mögliche neue SENV Geno- bzw. Subtypen sind mit Rechtecken gekennzeichnet.

Das Alignment und das Dendrogramm veranschaulichen deutlich die ausgeprägte Sequenzdivergenz. Die Isolate 102-2, 279-1, 387-3, 499-10, 19-9, 310-4, 385-7, 198-1 und 14-2 lassen sich nicht eindeutig den bekannten SENV-Geno-

typen A-H zuordnen. Sie zeigen jeweils Sequenzmerkmale einer neuen, eigenständigen Gruppe (Genotyp bzw. Subtyp) innerhalb des Dendrogramms.

Tabelle 7 listet diejenigen Isolate auf, die eindeutig den bekannten SENV-Prototypsequenzen zugeordnet werden konnten.

Tabelle 7:

Zuordnung der sequenzierten Isolate zu den SENV-Prototypsequenzen

SENV Prototypsequenzen							
SENV A	SENV B	SENV C	SENV D	SENV E	SENV F	SENV G	SENV H
199-1	33-10 673-4	-	174-9 147-1 288-5	326-19 283-5	435-1 320-3	-	138-6 195-9 96-1 299-3 114-10 221-3 91-2

3.4 Nachweis von SENV-spezifischen Antikörpern mittels ELISA unter Verwendung vier verschiedener Antigene

Mit Hilfe des ELISAs sollten SENV-spezifische IgG-Antikörper detektiert werden, die sowohl bei akuten als auch nach abgelaufenen bzw. chronischen Infektionen im Blut vorhanden sind. Die Epitopenanalyse und anschließende Synthese von vier SENV-spezifischen Peptiden, die als Antigene für den ELISA verwendet werden sollten, wurde von Dr. Hubert Kalbacher am Naturwissenschaftlich-Medizinischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Insgesamt wurden 47 der Seren mittels ELISA untersucht; von den restlichen drei Seren war nicht mehr genug Material vorhanden.

Peptid 16 reagierte nur mit einer Probe, die PCR-negativ war. Peptid 17 zeigte bei allen Seren positive Ergebnisse. Peptid 14 hatte in knapp einem Drittel aller

Seren an die Antikörper gebunden. Peptid 19 zeigte bei 41 Proben ein positives Ergebnis. Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8:

Nachweis SENV-spezifischer Antikörper mittels ELISA in 47 untersuchten Seren unter Verwendung vier verschiedener Peptide und Vergleich mit den PCR-Ergebnissen.

Peptid	14	16	17	19
Anzahl ELISA positiver Seren insgesamt	16	1	47	40
Anzahl SENV-PCR positiver Seren mit positivem ELISA Ergebnis	8	0	30	26
Anzahl SENV-PCR negativer Seren mit positivem ELISA Ergebnis	8	1	17	14
Anzahl PCR-positiver Seren mit negativem ELISA Ergebnis	22	30	0	4

3.5 Nachweis von SENV in Schweinen und Rindern

Es wurde jeweils Blut von 50 Rindern und Schweinen aus dem Probenkollektiv des Tierärztlichen Untersuchungsamts Aulendorf mittels PCR auf SEN-Viren untersucht. Lediglich in 10 (20 %) Rinderseren und 2 (4 %) Schweineseren konnte das Virus nachgewiesen werden.

Abbildung 12 zeigt eine Gelelektrophorese der SENV-PCR der Rinderseren und Abbildung 13 die der Schweinseren.

Für die Sequenzierung wurden aus den 10 positiven Rinderproben drei mit den kräftigsten Banden sowie die zwei positiven Schweineproben ausgewählt.

Die Sequenzen sind im Folgenden wiedergegeben. Von der Schweineprobe pig3b wurden zwei Klone (pig3b-1, pig3b-2) sequenziert.

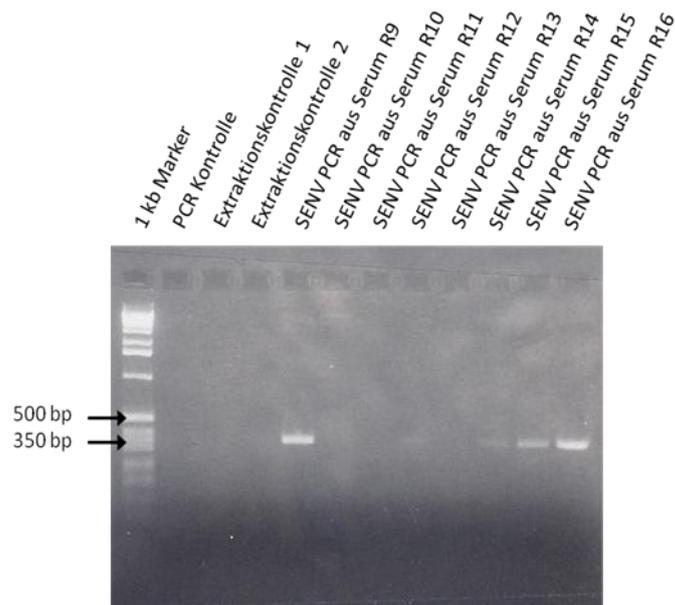


Abbildung 12:

Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der SENV-PCR der Rinderseren. Spur 1: 1 kbp Marker; Spur 2: PCR-Negativkontrolle (H₂O); Spuren 3 und 4: Extraktionsnegativkontrollen (H₂O); Spuren 5, 8, 10, 11, 12: PCR Produkte (Länge 350 bp) der jeweils aufgeführten Seren; Spuren 6, 7, 9: keine Amplifikate nachweisbar.

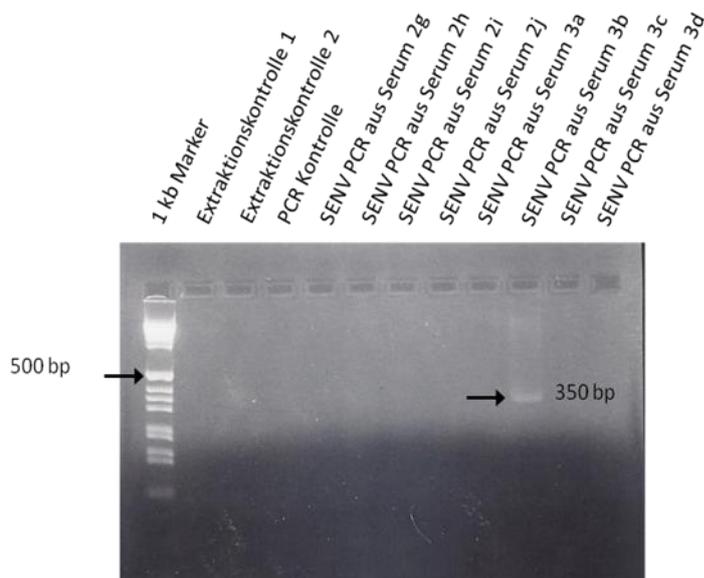


Abbildung 13:

Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der SENV-PCR der Schweineseren. Spur 1: 1 kbp Marker; Spuren 2 und 3: Extraktionsnegativkontrolle (H₂O); Spur 4: PCR-Negativkontrolle (H₂O); Spuren 5 – 9, 11, 12: keine Amplifikate nachweisbar; Spur 10: PCR-Produkt (Länge 350 bp) des aufgeführten Serums.

>pig 3b-1

TACTCATACGACCAGCTAGACCTCGCCAGATACAAAGGCTGCTCTTTTAAAATGTA
CAGACACCCCACAACACTGACTTTATACTGACTTATGACAACAATCCCCCATGAAAA
ACACTATATACAGCTCTCCTAACACGCACCCTGGCATCCTCATGCAACAGAAACAC
AGGGTACTCATACCTAGCTGGCTCACCTTTCCTAAAGGCAGAAAATATGTAAAGGT
TAAAATTCCTCCACCTAAATTATTTGAGGACCACTGGTACACTCAGCCTGACTTAT
GCAAAGTACCGCTCGTTACTCTGCGGTCAACCGCAGCTGACTTCAGACATCCGTT
CTGCTCACCACAAACA

>pig 3b-2

TACTCAAACGACCAGCTAGACCTCGCCAGATACAAAGGCTGCTCTTTTAAAATGTA
CAGACACCCCACAACACTGACTTTATACTGACTTATGACAACAATCCCCCATGAAAA
ACACTATATACAGCTCTCCTAACACGCACCCTGGCATCCTCATGCAACAGAAACAC
AGGGTACTCATACCTAGCTGGCTCACCTTTCCTAAAGGCAGAAAATATGTAAAGGT
TAAAATTCCTCCACCTAAATTATTTGAGGACCACTGGTACACTCAGCCTGACTTAT
GCAAAGTACCGCTCGTTACTCTGCGGTCAACCGCAGCTGACTTCAGACATCCGTT
CTGCTCACCACAAAC

>pig 1h-2

TACCCAAACGACCAGCTAGACCTGGCCAGATACAAAGGCTGCAGTTTTACTTTCTA
CAGACACAAAAAGACTGACTTTATAGTATGGTGGAAACAGAAAGCCTCCGTTTAAAC
TAAACAAGCTCAGCTGTGCATCCTTTCACCCAGGCATGCTCATGCAACAGAAAAA
CAAAGTGCTAATTCCTAGCTTTGACACTAAACCCGGGGGCAGAGCTAAAATTAGA
ATCAGAATAAAGCCCCCCTCTGTTAGAGGACAAGTGGTACACTCAGCAAGACT
TGTGTCTGGTAAACCTGGCGCAACTTGTGTTACTGCGGCTGACTTTCAACATCC
GTTCTGCTCACCACAAACA

>A05_R9-04_uni2.ab1

TACCCAAACGACCAGCTAGACCTGGCCAGATACAGGGGATGCAAATTCACCTTCT
ATAGAAACAAGATGACAGACTTTATAGCTCAATATGACATAGTGGCTCCGTACGCC
ATAGACAAGAACAGCAGCCCCTCGTACGCCCCGGGAATCATGATGCAGGCCAAA
AAGAAAATCCTAATTCCTAGCTACAACACTAAACCCAGGGGTCGCCAAAAAATATC
AGTTAGAATACCTCCCCCAAGCTATTTGTAGATAAGTGGTACTCGCAAGAAGACC
TGTGCAAAGTTAATCTTGTGTCACCTTGCAGTTTCTGCGGCTGACTTTGTACATCCG
TTCTGCTCACCACAAACA

>G04_R21-8_uni2.ab1

TACCCCAACGACCAGCTAGACCTGACCAGGTACAAGGGCTGCAAATTTAGCTTCT
ACAGACACCAGGACACTGACTTCATAGTGCAGTACGACACGGTTCCTCCCATGCA
AATGGACGAGTACACTTCACCCAACACACACCCCGCATTTCTTATGCAGGCTAAG
AAAAAGATAATAGTATACAGCTTCAAGACCAGGCCGGGGGGCAGAAAGAGGGTAA
CAGTTAGAGTAGCCCCCCTAAGTTGTTTGAAGACAAGTGGTACTCCCAGCACGA
CTTGTGCAAGGTCCACCTTGTGTCAGTTGGAGAGCAACCGCATGCAACTTGCGGTTT
CCGTTCTGCTCACCACAAACA

>A05_R42-1_uni2.ab1

TACCCAAACGACCAGCTAGACCTGGCCAGGTACAAGGGCTGCAAATTTAGCTTCT
ACAGACACCAGGACACTGACTTCATAGTGCAGTACGACACGGTTCCTCCCATGCA
AATGGACGAGTACACTTCACCCAACACACACCCCGCATTTCTTATGCAGGCTAAG
AAAAAGATAATAGTATACAGCTTCAAGACCAGGCCGGGGGGCAGAAAGGGGGTA
ACAGTTAGAGTAGCCCCCCTAAGTTGTTTGAAGACAAGTGGTACTCCCAGCACG

ACTTGTGCAAGGTCCACCTTGTGAGTTGGAGAGCAACCGCATGCAACTTGCGGTT
 TCCGTTCTGCTCACCACAAACA

Es wurde ein Alignment mit dem Programm DiAlign professional (Version 3.1.5;
www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl) erstellt (vgl. Abbildung 14).

Unterhalb des Alignments sind die polymorphen Nukleotidpositionen jeweils mit
 einem Sternchen gekennzeichnet.

```

      1              11..... 21..... 31..... 41.....
pig-3b-2  1  TACTCAAACG ACCAGCTAGA CCTCGCCAGA TACAAAGGCT GCTCTTTTAA
pig-1h-2  1  TACCCAAACG ACCAGCTAGA CCTGGCCAGA TACAAAGGCT GCAGTTTTAC
A05_R9-04 1  TACCCAAACG ACCAGCTAGA CCTGGCCAGA TACAGGGGAT GCAAATTCAC
G04_R21-8 1  TACCCCAACG ACCAGCTAGA CCTGACCAGG TACAAGGGCT GCAAATTTAG
A05_R42-1 1  TACCCAAACG ACCAGCTAGA CCTGGCCAGG TACAAGGGCT GCAAATTTAG
          *  * *                * * * * * * * * * * * * * * * * * *

      51..... 61..... 71..... 81..... 91.....
pig-3b-2  51  AATGTACAGA CACCCACAA CTGACTTTAT ACTGACTTAT GACAACAATC
pig-1h-2  51  TTTCTACAGA CACAAAAAGA CTGACTTTAT AGTATGGTGG AACAGAAAGC
A05_R9-04 51  CTTCTATAGA AACAAAGATGA CAGACTTTAT AGCTCAATAT GACATAGTGG
G04_R21-8 51  CTTCTACAGA CACCAGGACA CTGACTTCAT AGTGCAGTAC GACACGGTTC
A05_R42-1 51  CTTCTACAGA CACCAGGACA CTGACTTCAT AGTGCAGTAT GACACGGTTC
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

     101..... 111..... 121..... 131..... 141.....
pig-3b-2  101  CCCCCATGAA AAACACTATA TACAGCTCTC CTAACACGCA CCCTGGCATC
pig-1h-2  101  CTCCGTTTAA ACTAAACAAG ctcagctgtg caTCCTTTCA CCCAGGCATG
A05_R9-04 101  CTCCGTACGC CATAGACAAG AACAGCAGCC CCTCGTACGC CCCGGGAATC
G04_R21-8 101  CTCCCATGCA AATGGACGAG TACACTTCAC CCAACACACA CCCC GCATTT
A05_R42-1 101  CTCCCATGCA AATGGACGAG TACACTTCAC CCAACACACA CCCC GCATTT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

     151..... 161..... 171..... 181..... 191.....
pig-3b-2  151  CTCATGCAAC AGAAACACAG GGTACTCATA CCTAGCTGGC TCACCTTTCC
pig-1h-2  151  CTCATGCAAC AGAAAAACAA AGTGCTAATT CCTAGCTTTG AACTAAACC
A05_R9-04 151  ATGATGCAGG CCAAAAAGAA AATCCTAATT CCTAGCTACA AACTAAACC
G04_R21-8 151  CTTATGCAGG CTAAGAAAAA GATAATAGTA TACAGCTTCA AGACCAGGCC
A05_R42-1 151  CTTATGCAGG CTAAGAAAAA GATAATAGTA TACAGCTTCA AGACCAGGCC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

     201..... 211..... 221..... 231..... 241.....
pig-3b-2  201  TAAAGGCAGA AAATATGTAA AGGTAAAAAT TCCTCCACCT AAATTATTTG
pig-1h-2  201  CGGGGGCAGA GCTAAAATTA GAATCAGAAT AAAGCCCCCC ACTCTGTTAG
A05_R9-04 201  CAGGGGTCGC CAAAAAATAT CAGTTAGAAT ACCTCCCCCC AAGCTATTTG
G04_R21-8 201  GGGGGGCAGA AAGAGGGTAA CAGTTAGAGT AGccCCCCCT AAGTTGTTTG
A05_R42-1 201  GGGGGGCAGA AAGGGGGTAA CAGTTAGAGT AGccCCCCCT AAGTTGTTTG
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

Fortsetzung Abbildung 14:

```

                251..... 261..... 271..... 281..... 291.....
pig-3b-2  251 AGGACCACTG GTACTCTCAG CCTGACTTAT GCAAAGTACC GCTCGTTACT
pig-1h-2  251 AGGACAAGTG GTACTCTCAG CAAGACTTGT GTCTGGTAAA CCTGGCGCAA
A05_R9-04 251 TAGATAAGTG GTACTCGCAA GAAGACCTGT GCAAAGTTAA TCTTGTGTCA
G04_R21-8 251 AAGACAAGTG GTACTCCCAG CACGACTTGT GCAAGGTCCA CCTTGTCAGT
A05_R42-1 251 AAGACAAGTG GTACTCCCAG CACGACTTGT GCAAGGTCCA CCTTGTCAGT
                **  ** *          * * * *** * *   ****  *** * * *****

                301..... 311..... 321..... 331..... 341.....
pig-3b-2  301 CTGCGGTCAA CCGCAGCTGA CTTCAGACAT CCGTTCTGCT CACCACAAac
pig-1h-2  301 CTTGTGGTTA CTGCGGCTGA CTTTCAACAT CCGTTCTGCT CACCACAAAC
A05_R9-04 301 CTTGCGGTTT CTGCGGCTGA CTTTGTACAT CCGTTCTGCT CACCACAAAC
G04_R21-8 301 TGGAGAGCAA CCGCATGCAA CTTGCGGTTT CCGTTCTGCT CACCACAAAC
A05_R42-1 301 TGGAGAGCAA CCGCATGCAA CTTGCGGTTT CCGTTCTGCT CACCACAAAC
                ***** * ***** ***** **

                351
pig-3b-2  351 -
pig-1h-2  351 A
A05_R9-04 351 A
G04_R21-8 351 A
A05_R42-1 351 A

```

Abbildung 14:

Alignment der 5 SENV-Sequenzen von 2 Schweinen (pig-3b-2 und pig-1h-2) und 3 Rindern (A05_R9-04, G04_R21-8, A05_R42-1). Die PCR-Primersequenzen SEN A1F und SEN A1R sind durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben.

* markiert Sequenzunterschiede an der entsprechenden Nukleotidposition.

Die Sequenzen der beiden Klone pig3b-1 und pig3b-2 waren identisch. In der Sequenz von pig3b-1 gab es innerhalb des Primers eine Fehlpaarung: An der Position der Wobble-Base M (= A oder C) im Primer steht bei Pig3b-1 ein T. Ob dies ein Sequenzierungsfehler ist oder aber der biologischen Realität entspricht, ließ sich nicht eindeutig entscheiden. Die SENV-Sequenzen G04_R21-8 und A05_R42-1 vom Rind unterscheiden sich lediglich in 2 Nukleotiden.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden Patientenproben aus einer Spezialambulanz für Geschlechtskrankheiten in Nigeria auf humane Anelloviren (TT- bzw. SEN-Viren) untersucht, um die Prävalenz in dieser Region zu ermitteln. Zusätzlich wurden Schweine und Rinder von deutschen Bauernhöfen analysiert, um einen ersten Einblick der Virusprävalenz in domestizierten Tieren zu bekommen, die eng mit dem Mensch zusammenleben. Diese Ergebnisse können Hinweise auf einen möglichen Übertragungsweg vom Tier auf den Menschen bzw. umgekehrt geben.

4.1 Vergleich der Prävalenzen von SENV und TTV mit HIV, Hepatitis A, Hepatitis B und Hepatitis C

TT-Viren sind bislang in der Literatur nicht als pathogene Viren an sich beschrieben. Sie verursachen keine eigenständige Erkrankung, sondern das Auftreten von TTV in Koexistenz mit Pathogenen wie HIV und Hepatitis-Viren lässt vielmehr einen schlechteren Verlauf der durch diese Viren ausgelösten Erkrankung erwarten (Moriyama *et al.* 2001, Biagini *et al.* 2003, Bando *et al.* 2008). Die Entdeckung der TT-Viren beruhte auf der Tatsache, dass bei für Hepatitis-Viren negativen Patienten dennoch eine Hepatitis bestand, jedoch mit unklarer Ätiologie und gleichzeitigem Nachweis von TTV bzw. SENV. Es wurde daher angenommen, dass TTV und SENV in bestimmten Konstellationen Hepatitis auslösen bzw. begünstigen können. Aus diesem Grund wurden die Prävalenzen von TTV und SENV in den untersuchten Seren mit dem Auftreten von Hepatitis-A, Hepatitis-B und Hepatitis-C sowie HIV verglichen. Dadurch ist es auch möglich Hinweise auf eventuelle gemeinsame Infektionswege oder sich gegenseitig begünstigende Koinfektionen zu finden.

Humanes Immundefizienzvirus (HIV)

Die HIV-Prävalenz in den aus dem Jahr 1986 stammenden Proben aus Nigeria lag bei 1 % (Weimer 1990) und damit deutlich unter den heutzutage ermittelten Prävalenzen von bis zu 10 % je nach geographischer Region in Nigeria

(UNAIDS 2012). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass 1986 die HIV-Welle dieses Gebiet noch nicht voll erfasst hatte. HIV wurde 1986 Jahr erstmals in Nigeria nachgewiesen. 1991 lag die durchschnittliche Prävalenz bei 1,8 %, 1993 bei 3,8 %, 1996 bei 4,5 % und 1999 bei 5,4 % (Federal Ministry of Health 2008).

Hepatitis-A-Virus (HAV)

Die Rate an Hepatitis-A-Infektionen lag in den untersuchten Seren bei 96 % (Bölke 1993). Die Prävalenz ist in Afrika seit vielen Jahren gleich bleibend hoch bei > 90% (Sule *et al.* 2013). Sicher spielt für die hohe Prävalenz die Übertragung von HAV aufgrund mangelhafter hygienischer Verhältnisse (fäkal-orale Route) eine wesentliche Rolle. Ein direkter Vergleich der Prävalenzen von HAV und TTV ist nicht möglich, weil die Antikörper bei HAV eine abgelaufene Infektion nachweisen, die PCR für TTV jedoch nur eine frische oder chronisch persistierende. Der Prozentsatz an abgelaufenen Erkrankungen kann mit einer nur auf der PCR basierenden Diagnose nicht erfasst werden.

Hepatitis-B-Virus-(HBV)

In den Proben von 1986 hatte Dr. Sabine Schleicher (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Abteilung I der Universität Tübingen) knapp 22 % der Patienten als positiv für Hepatitis B (HBsAg) getestet (Dr. S. Schleicher, persönliche Mitteilung). Aktuell liegt die Infektionsrate in Nigeria bei ca. 10 % (Motayo *et al.* 2014). Dass die Prävalenz in den hier untersuchten Proben bereits 1986 an der oberen Grenze der aktuellen Infektionsrate lag, dürfte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass es sich um Patienten aus einer Hochrisikogruppe handelt, bei denen generell höhere Prävalenzraten von sexuell übertragbaren Viren zu erwarten sind.

Die Prävalenzen von TTV (38 %) und dem Genotyp SEN im speziellen (64 %) liegen im Vergleich mit Hepatitis B deutlich höher, was dafür spricht, daß neben der sexuellen Übertragung noch andere Infektionswege wie zum Beispiel die fäkal-orale Transmission eine Rolle spielen könnten.

Hepatitis-C-Virus

Hepatitis-C ist eine Infektionskrankheit beim Menschen und zeichnet sich durch eine hohe Rate an Chronifizierung aus, die zu Leberzellschäden, Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom führen kann. Die Übertragung erfolgt überwiegend parenteral über Blut und Blutprodukte. In einer Studie von Kouyos *et al.* (2014) wird darüberhinaus eine sexuelle Übertragung z. B. über Blutaustausch bei homosexuellen Kontakten für möglich gehalten. In den für diese Arbeit untersuchten Proben waren 5 Patienten (10 %) anti-HCV positiv (Dr. S. Schleicher persönliche Mitteilung). Diese Prävalenz ist höher als die durchschnittliche für Afrika insgesamt, welche 5,4 % beträgt (Alao *et al.* 2008). Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die nigerianische Patientengruppe einer Hochrisikogruppe für Geschlechtskrankheiten angehört und deshalb eine höhere Prävalenz erwartet werden kann. Verglichen mit den Prävalenzen von TTV und SENV ist die Hepatitis C Prävalenz wesentlich niedriger. Sicher spielen mangelhafte hygienische Verhältnisse (fäkal-orale Route) für die hohe Prävalenz der TT-Viren eine wesentliche Rolle.

4.2 TTV und SENV Prävalenz im untersuchten Patientenkollektiv einer Ambulanz für Geschlechtskrankheiten in Lagos, Nigeria

TTV-Prävalenz

Die mittels PCR ermittelte Prävalenz für TTV betrug 38 % im untersuchten Patientenkollektiv aus Nigeria und war damit um 6 % geringer als die niedrigste der von Prescott *et al.* (1998) angegebenen Häufigkeiten für Afrika. Die Proben von Prescott stammten jedoch aus den 90er Jahren, einer Periode, von der man annehmen kann, dass die Durchseuchung im Vergleich zu 1986 bereits deutlich vorangeschritten war. Dies steht allerdings im Widerspruch zur These von Ball *et al.* (1999), die davon ausgeht, dass TTV schon mehrere Millionen Jahre existiert und somit die Durchseuchungsrate ohnehin extrem hoch sein muss und sich vermutlich in einem kurzen Zeitraum von nur 20 Jahren im Vergleich zu den Jahrhunderten vorher nicht wesentlich verändert haben sollte. Die von Prescott *et al.* (1998) angegebenen Prävalenzen schwanken jedoch zwischen den einzelnen Ländern sehr stark: Kongo: 44 %, Nigeria: 52 %, Gambia: 83 %. Ursachen hierfür, können regionale und kulturelle Unterschiede

der verschiedenen Bevölkerungsgruppen sein, sowie die unterschiedlichen Untersuchungskollektive, die Anzahl der Probanden und die verwendeten Primer für den PCR-Nachweis der humanen Anelloviren.

SENV-Prävalenz

Die in den nigerianischen Proben ermittelten Prävalenz für SEN-Viren von 64 % ist im Vergleich zu europäischen Ländern mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 1 % bis 25 % (Mushawar *et al.* 2000, Bowden *et al.* 2001, Schreter *et al.* 2006, Serin *et al.* 2006) sehr hoch. Dies ist nicht erstaunlich, weil es sich um Patienten einer Sexualambulanz handelte, bei denen eine hohe Prävalenz dieser Viren generell zu erwarten ist. Eine ebenfalls recht hohe Prävalenz von 46.7 % fanden Mohammed *et al.* (2011) auch für eine ebenfalls von der Normalbevölkerung abweichende Population von Patienten mit Hämodialyse und multiplen Bluttransfusionen.

4.3 Nachweis SENV-spezifischer Antikörper mittels ELISA

Mit der PCR wurden akute und chronische Anellovirusinfektionen in den Seren nachgewiesen. Zusätzlich wurden ELISAs durchgeführt, um sowohl frische als auch bereits abgelaufene und chronische Infektionen anhand der im Blut zirkulierenden Antikörper nachzuweisen.

Es gibt nur wenige Untersuchungen zur Bildung von Antikörpern in mit TTV Infizierten und keine speziell für den Genotyp SEN. Eine Infektion mit TTV verursacht im Körper die Bildung von IgM- und IgG-Antikörpern. Mittels Immunopräzipitation waren die IgM über 5 - 11 Wochen nachweisbar und zeigten folglich eine frische Infektion an. IgG waren dagegen auch noch nach über 4 Jahren nachweisbar, nicht jedoch TTV-DNA. (Tsuda *et al.* 1999, Tsuda *et al.* 2001) In der vorliegenden Arbeit wurden 4 verschiedene Peptide zur Detektion von SENV-spezifischen Antikörpern getestet. Ziel war es, Peptide zu finden, die Antikörper gegen verschiedene Epitope der SEN-Proteine detektieren können. Ist sowohl der ELISA als auch die SENV-PCR positiv, so ist von einer chronischen Infektion mit erfolgter Antikörperbildung auszugehen. Ist der ELISA positiv und die PCR negativ, sind Antikörper vorhanden, das Virus an sich jedoch nicht mehr nachzuweisen, was für eine abgelaufene Infektion spricht. Ist lediglich die PCR positiv und der ELISA negativ, dann ist die Infektion sehr frisch und es hat noch keine Antikörperbildung stattgefunden.

Da Peptid 16 lediglich mit einer Probe reagierte, deren PCR negativ war (Tabelle 7), würde man hier von einer abgelaufenen Infektion mit Antikörperbildung ausgehen. Dieses Peptid ist jedoch nicht geeignet, da man bei einer hohen Durchseuchung mit SENV auch eine hohe Antikörperprävalenz annehmen muss.

Peptid 14 hatte in 16 der 47 Seren Antikörper gebunden. Diese Zahl scheint im Hinblick auf die hohe Prävalenz von 64 % im Patientengut relativ niedrig. Die Tatsache, dass der ELISA mit Peptid 14 für 22 Patienten, die einen positiven PCR-Nachweis hatten, negativ war, deutet darauf hin, dass Peptid 14 eher ungeeignet ist, weil eine so große Anzahl frischer Infektionen ohne Antikörperbildung nicht wahrscheinlich ist.

Der ELISA mit Peptid 19 war für 40 der 47 Proben positiv, die PCR nur für 30. Von den 7 negativen ELISA-Proben, waren 4 PCR-positiv; dies spricht für eine sehr frische Infektion, die noch nicht zur Antikörperbildung geführt hatte. Von den 40 Patienten mit positivem ELISA hatten 14 eine offensichtlich bereits abgelaufene Infektion, da die PCR negativ war. Für die restlichen 26 Patienten konnte bezüglich des Peptid 19 nicht zwischen einer frischen oder chronischen Infektion unterschieden werden, weil sowohl die SENV-PCR als auch der ELISA positiv waren. Dafür müsste man die Antikörper noch bezüglich des Vorliegens von IgM bzw. IgG analysieren. Der ELISA mit Peptid 17 war für alle 47 Seren positiv. Ob dies die biologische Realität widerspiegelt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht entscheiden, auch wenn Ott *et al.* (2000) gezeigt hatten, dass der Nachweis von Antikörpern gegen humane Anelloviren bei französischen Blutspendern, Patienten mit Hepatitis unklarer Genese und gesunden Kindern 98,6 % betragen kann. Auch eine unspezifische Bindung an andere TTV-Antikörper als nur dem SENV-Antikörper könnte eine Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter Berücksichtigung der bekannt hohen Prävalenz des SENV von den 4 getesteten Peptiden die Nr. 17 und 19 für die Etablierung eines ELISA zum Nachweis SENV-spezifischer Antikörper am besten geeignet wären.

4.4. Korrelation von Alter und Geschlecht mit einer Anellovirusinfektion

Von den 50 untersuchten Patientenproben stammten 35 von Männern und 15 von Frauen. Unter den Männern waren 86,6 % TTV positiv, jedoch nur 13,3 % der Frauen. Auch von dem Genotyp SEN waren Männer deutlich häufiger betroffen als Frauen (80 % versus 20 %). Die höhere Infektionsrate bei Männern könnte auf eine größere Anzahl an Sexualpartnern, erhöhte Promiskuität sowie homosexuelle Kontakte zurückzuführen sein.

Das Vorliegen von TTV bzw. SENV Infektionen war nicht mit dem Alter korreliert. Andere Studien zeigten jedoch, dass die Prävalenz mit dem Durchschnittsalter der untersuchten Population stieg (Peng *et al.* 2002, Saback *et al.* 1999, Sugiyama *et al.* 1999). Je jünger die untersuchten Personen waren, desto weniger TTV-Mischinfektionen lagen vor (Saback *et al.* 1999, Saback *et al.* 2002, Puig-Bagagoiti *et al.* 2000). Dass es in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen Alter und TTV- oder SENV-Infektion gab, könnte daran liegen, dass der jüngste untersuchte Patient 16 Jahre alt war und in diesem Alter die Durchseuchung bereits weiter fortgeschritten ist als vor der Pubertät. Nur die Untersuchung einer noch jüngeren Population könnte darüber Aufschluss geben.

4.5 Korrelation von Geschlechtskrankheiten mit einer Anellovirusinfektion

Von allen erfassten Krankheiten war die nicht gonorrhöische *Urethritis* am häufigsten mit einer TTV-Infektion vergesellschaftet (46 % der betroffenen Männer waren positiv für TTV und 69 % für den Genotyp SEN; nur Männer litten an *Urethritis*). Die Ursache für diese Erkrankung können verschiedene Bakterien sein, am häufigsten wird sie durch Chlamydien ausgelöst. Männer und vor allem homosexuelle Männer sind häufiger betroffen als Frauen. In der Studienpopulation war *Urethritis* die Geschlechtskrankheit mit den meisten TTV Infektionen. Die am zweithäufigsten mit TTV vergesellschaftete Erkrankung war *Lues* (60 % der Betroffenen waren TTV-positiv und 50% speziell für den Genotyp SEN), eine Erkrankung, die den ganzen Körper betrifft und im ersten Stadium charakteristische Hautveränderungen bewirkt und im weiteren Verlauf

auch das Nervensystem angreift. Sie ist durch sexuelle Kontakte oder Kontakt mit den infektiösen Papeln der Haut übertragbar. Auch maternale Übertragung während der Schwangerschaft ist möglich (Herold *et al.* 2013).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die TTV-Infektionen am häufigsten bei Patienten auftraten, die auch an den generell am häufigsten sexuell übertragenen Erkrankungen wie *Urethritis*, *Lues* und *Gonorrhoe* litten. Bei allen Patienten mit *Trichomoniasis* und *Herpes genitalis*, zwei ebenfalls hochansteckende und sexuell übertragene Krankheiten, lag der SEN-Genotyp vor. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass auch TTV sexuell übertragbar ist. Die eine an *Cystitis* erkrankte Person hatte keine Infektionen. Dies überrascht nicht, weil *Cystitis* nicht durch sexuelle Kontakte übertragen wird, sondern durch *Escherichia coli* hervorgerufen wird.

Fünf Frauen mit genitaler *Candidose*, einer nicht ansteckenden Pilzinfektion, die ebenfalls nicht sexuell übertragen wird, waren positiv für den SEN-Genotyp. Eventuell ist durch die Pilzinfektion die Vaginalschleimhaut so vulnerabel, dass SENV auf diese Weise durch Mikroblutungen übertragen werden kann.

Bei drei Männern lag eine unbekannte Erkrankung vor; alle waren ebenfalls positiv für den SEN-Genotyp und einer zusätzlich für TTV im Allgemeinen. Allein aufgrund der zur Verfügung stehenden Daten kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich bei dieser unbekannten Erkrankung um eine ebenfalls sexuell übertragbare Krankheit handelte. Da alle drei Patienten jedoch positiv für TTV waren, liegt diese Annahme nahe.

4.6 Genetische Variabilität

Im Vergleich zu anderen Humanviren weist TTV eine deutlich höhere genetische Variabilität auf. Weil bisher keine DNA-Polymerase im TTV-Genom identifiziert werden konnte nutzt das Virus zur Replikation vermutlich die Polymerase des Wirtes. So könnte das Virus bereits Jahrtausende in verschiedenen Lebewesen existiert haben (Ball *et al.* 1999). Worobey *et al.* (2000) sind der Meinung, dass die Ursache für die hohe Variabilität nicht allein die sogenannten „immune escape“ Mutationen sein können, denn sie wiesen

anhand von Sequenzanalysen nach, dass fast die Hälfte der Variabilität auf Rekombinationen zurückzuführen war. Die Rekombinationen traten in den nicht kodierenden Genomregionen signifikant häufiger auf als in den kodierenden. Das bedeutet, dass für den Nachweis der Anelloviren mittels PCR die nicht kodierende Genomregion herangezogen werden sollte, um möglichst alle Mutationen zu detektieren. Es werden auf diese Weise sicherlich immer mehr und mehr TTV-Genotypen bzw. Subtypen gefunden werden, die eine Anpassung der Klassifikation notwendig machen werden. Für diese Arbeit standen insgesamt 26 Sequenzen aus der kodierenden Region des SEN-Genotyps zur Verfügung. Außer den Protogenotypen A – H fanden sich darunter neun neue Subtypen, die deutlich von den Protogenotypen abwichen. Diese wurden allerdings noch nicht mit der Sequenz des neuen, von Kojima *et al.* (2003) nachgewiesenen Genotyps SEN-Virus I verglichen.

4.7 SENV-Prävalenz bei Schweinen und Rindern in Deutschland

Bevor TTV und der Genotyp SENV in die *Anelloviridae* eingeordnet wurden, gehörten sie zur Familie der *Circoviridae*. Zu dieser Familie zählen auch eine Reihe von Viren aus dem Tierreich, wie z. B. das porcine Circovirus Typ 1 (PCV1, Mankertz *et al.* 1997) und Typ 2 (PCV2, Hamel *et al.* 1998), das beak and feather- disease virus (BFDV; Bassami *et al.* 1998), das pigeon oder columbid circovirus (PiCV, CoCV; Mankertz *et al.* 2000), das goose circovirus (GoCV; Todd *et al.* 2001) und das canary circovirus (CaCV; Phenix *et al.* 2001). Diese besitzen Ähnlichkeiten mit TTV (Biagini *et al.* 2000, Hino *et al.* 2002; Okamoto *et al.* 2000b), sowie dem Torque-Teno-Mini-Virus (Takahashi *et al.* 2000b) und dem small anellovirus (SAV; Biagini *et al.* 2006).

Das porcine Circovirus Typ I gilt als apathogen, weil es weder pathogene Effekte in experimentell infizierten Tieren auslöste, noch wurden cytopathische Effekte in Zellkulturen beobachtet (Tischer *et al.* 1986). Dann trat jedoch zu Beginn der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts eine multifaktorielle Krankheit

in einer Schweineherde in Kanada auf. Als Erreger dieser „postweaning multisystemic wasting syndrome“ genannten Erkrankung wurde ein neues Circovirus identifiziert, das porcine Circovirus Typ 2 (Hamel *et al.* 1998, Meehan *et al.* 1998, Morozov *et al.* 1998).

Im Hinblick darauf, dass Circoviren für Tiere pathogen sein können und mit der Frage nach der fäkal-oralen Übertragung wurden in dieser Arbeit Schweine und Rinder auf das Vorhandensein von SEN-Viren untersucht. Von den untersuchten 50 Schweineseren waren zwei (4 %) positiv für SEN-Virus DNA. In den 50 Rinderseren wurden bei zehn Tieren (20 %) SENV nachgewiesen. Diese Tiere zeigten keine Krankheitszeichen. SEN-Viren sind also im Vergleich zu dem porcinen Circovirus Typ 2 für Tiere nicht pathogen. Eine Übertragung von Mensch zu Tier sowie umgekehrt kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden und sollte als zusätzlicher Transmissionsweg in Betracht gezogen werden. Besonders in Regionen und Ländern in denen Menschen und Tiere auf engstem Raum miteinander leben, könnte die Durchseuchung bei Mensch und Tier größer sein. Um diese Vermutung zu überprüfen, müsste jedoch eine sehr viel größere Anzahl an Tieren aus verschiedenen geographischen Regionen untersucht werden.

4.8 Ausblick

Um die Pathologie und Transmissionswege der TT-Viren im Detail aufzuklären, müssten sehr viele Human- und Umweltproben analysiert werden. Daher sind schnelle und kostengünstige Nachweisverfahren wünschenswert. Um die Daten verschiedener Labore untereinander vergleichen zu können, müssen diese sich zuvor auf eine Standardprozedur einigen (Verwendung derselben Primer, der zu amplifizierenden Genomregion, PCR-Bedingungen etc.). Die Prävalenzen sollten für die einzelnen Genotypen ermittelt werden, um Mischinfektionen mit verschiedenen Genotypen bzw. darüber hinaus auch Mischinfektionen mit anderen Erregern festzustellen. Daraus lassen sich dann Rückschlüsse zur

Behandlung von schwerwiegenden Erkrankungen ziehen, die eventuell durch TT-Viren verstärkt bzw. begünstigt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Durchseuchungsrate mit Anelloviren in Nigeria anhand von Serumproben aus den 1980er Jahren aus einer speziellen Ambulanz für sexuell übertragbare Krankheiten mittels PCR und ELISA untersucht. Vom SEN-Genotyp wurde ein Teil der kodierende Region und von TTV die nicht kodierende Region mit einer nested-PCR amplifiziert. Zudem wurden 47 Seren mit einem ELISA auf frische, bereits abgelaufene oder chronische Infektionen untersucht. Zum Nachweis von SENV-Antikörpern wurden jeweils vier verschiedene synthetische Peptide verwendet, um dasjenige zu ermitteln, welches zum Nachweis SENV-spezifischer Antikörper die besten Ergebnisse liefert. Basierend auf der Epitopanalyse wurden vier verschiedene Peptide zur Etablierung und Validierung eines ELISA verwendet.

Die im Vergleich mit späteren Studien aus unterschiedlichen afrikanischen Ländern geringe Durchseuchung mit SENV von 64 % kann verschiedene Ursachen haben. So können die Auswahl des Untersuchungskollektivs, die Anzahl der getesteten Proben, sowie die für den PCR-Nachweis verwendete Genomregion einen großen Einfluß auf die Prävalenzdaten haben.

Im untersuchten Patientenkollektiv wiesen Männer mehr SENV-Infektionen auf als die Frauen, allerdings war die Stichprobe bzgl. der Geschlechter nicht ausgewogen (36 Männer, 14 Frauen). Die Ursache könnte eine höhere sexuelle Aktivität der Männer mit wechselnden Partnerinnen sein oder aber auch die bekannte höhere Ansteckungsrate unter homosexuellen Männern. Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Alter und Infektionsrate.

Die Infektionsrate für TTV und SENV war bei den am häufigsten sexuell übertragbaren Erkrankungen wie *Urethritis*, *Gonorrhoe* und *Lues* am höchsten, während Personen mit nicht sexuell übertragbaren Krankheiten wie z. B. *Cystitis*, keine Infektionen aufwiesen. Dies bestätigt die Hypothese, dass TTV und SENV auch sexuell übertragen werden können.

Mittels ELISA wurden zusätzlich SENV-Antikörper nachgewiesen. Durch Vergleich mit den PCR-Ergebnissen ließen sich daraus Rückschlüsse ziehen, ob eine Infektion relativ frisch oder bereits abgelaufen oder chronisch-persistierend war. Die Peptide 17 und 19 detektierten die meisten Infektionen und eignen sich daher am ehesten zur Entwicklung eines ELISAs.

Zusätzlich zu den humanen Seren wurden je 50 Schweine und Rinder aus Süddeutschland mittels PCR auf das Vorhandensein von humanen Anelloviren untersucht. Bei den Schweinen lag die Infektionsrate bei 4 % und bei den Rindern bei 20 %. Dies legt die Vermutung nahe, dass SENV und TTV ebenfalls eine Zoonose hervorrufen können, was einen weiteren Übertragungsweg für diese Viren darstellen kann.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe K, Inami T, Asano K, Miyoshi C, Masaka N, Hayashi S, Ishikawa K, Takebe Y, Win KM, El-Zayadin AR, Han KH, Zhang DY. (1999) TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. *J Clin Microbiol* 37: 2703-2705.
- Akiba J, Umemura T, Alter HJ, Kojiro M, Tabor E. (2005) SEN virus: epidemiology and characteristics of a transfusion-transmitted virus. *Transfusion* 45 (7): 1084-1088.
- Alao O, Okwori E, Araoye M. (2008) The sero-Prevalence of Hepatitis C Virus (HCV) Infection Among Prospective Blood Donors in a Nigerian Tertiary Health Institution. *Int J Epidemiol* 7 (2); ohne Seitenangabe weil ausschließlich digitales Journal: <http://ispub.com/IJE/7/2/8295>
- Alter HJ, Bradley DW. (1995) Non-A, Non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (Non-ABC). *Seminars in Liver Disease* 15: 110-120.
- Asabe S, Nishizawa T, Iwanari H. (2001) Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 298-304.
- Ball J, Curran R, Berridge S. (1999) TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol* 80: 1759-1768.
- Bando M, Ohno S, Oshikawa K, Sugiyama Y. (2001) Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine* 95: 935-942.
- Bando M, Takahashi M, Ohno S. (2008) Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer. *Respirology* 13: 263-269.
- Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR. (1998) Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circovirus and chicken anemia virus. *Virology* 249: 453-9.
- Berg T, Schreie E, Heuft HG, Hohne M. (1999) Occurrence of a novel DNA virus (TTV) infection in patients with liver diseases and its frequency in blood donors. *J. Med Virol* 59: 117-121.

- Biagini P, Gallian P, Cantaloube JF, de Micco P. (1998) Presence of TT-Virus in french blood donors and intravenous drug users. *J Hepatol* 29: 684-685.
- Biagini P, Attoui H, Gallian P, Touinssi M, Cantaloube JF, de Micco P, de Lamballerie X. (2000) Complete sequences of two highly divergent european isolates of TT virus. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 837-41.
- Biagini P, Gallian P, Attoui H. (2001) Comparison of systems performance for TT virus detection using PCR primer sets located in non-coding and coding regions of the viral genome. *J Clin Virol* 22: 91-99.
- Biagini P, Charell RN, de Micco P, de Lamballerie X. (2003) Association of TT virus primary infection with rhinitis in a newborn. *Clin Infect Dis* 36: 128-129.
- Biagini P, Todd D, Bendinelli M, Hino S, Mankertz A, Mishiro S, Niel C, Okamoto H, Radial S, Ritchie BW, Teo GC. (2005) Anellovirus. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds.) *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy on Viruses*. Elsevier/Academic Press, San Diego, CA (USA); p. 335-341.
- Bölke EKA. (1993) *Epidemiologische Untersuchungen von Hepatitis-A, Hepatitis-B und von HIV in deutschen und westafrikanischen Populationen*. Dissertation, Universität Tübingen
- Borawski J, Kovalchuk O, Chlebinska I, Naumnik B, Rydzewska-Rosolowska A, Chyczewski L, Mysliwiec M. (2006) SEN virus infection in maintenance hemodialysis patients. *Wiad Lek* 59 (11-12): 751-756.
- Bowden S. (2001) New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 124-131.
- Cao K, Mizzokami M, Orito E, Ding X, Ge XM, Huang GY, Ueda R. (1999) TT virus infection among IVDUs in south western China. *Scand J Infect Dis* 31: 21-25.
- Charlton M, Adjei P, Poterucha J, Zein N, Moore B, Therneau T, Krom R, Wiesner R. (1998) TT-Virus infection in North American blood donors, Patients with fulminant hepatic failure, and crytogenic cirrhosis. *Hepatology* 28: 839-842.
- Chiou SS, Huang JF, Chang TT, Hsieh MY, Dai CY, Yu ML, Chang WY, Chuang WL. (2006) SEN and Hepatitis virus Infections in Nontransfused Children and Pediatric Thalassemia patients with multiple Transfusions in Taiwan. *Digestion* 74 (3-4): 208-14.

- Davidson F, MacDonald D, Mokili JIK, Prescott LE, Graham S, Simmonds P. (1999) Early acquisition of TT virus (TTV) in an area endemic for TTV infection. *J Infect Dis* 179: 1070-1076.
- Desai SM, Muerhoff AS, Leary TP, Erker JC, Simons JN, Chalmers ML, Birkenmeyer LG, Pilot-Matias T, Mushawar IK. (1999) Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses. *J Infect Dis* 179 (5): 1242-1244.
- Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML, Mushawar IK. (1999) Analysis of TT virus full-length genomic sequences. *J Gen Virol* 80: 1743-1750.
- Fabris P, Biasin MR, Infantolino D, Tositti G, Venza E, Floreani A, Zanetti A, de Lalla F. (2000) TTV infection in patients with acute hepatitis of defined aetiology and in Non-A-E-hepatitis. *J Hepatology* 32: 661-665.
- Federal Ministry of Health Nigeria. (2008) National HIV/AIDS and Reproductive Health Survey (NARHS Plus 2007) Abuja Nigeria. <http://www.nepwhan.net/assets/NigeriaNARHSPlus2007.pdf>. Letzter Zugriff: 15.07.2014
- Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, Pignoloni P, Pulsoni A, Sourdis J, Pescarmona E, Vitolo D, Mandelli F. (2003) Detection of TT virus in lymph node biopsy of B-cell lymphoma and Hodgkins disease, and its association with EBV infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16: 109-118.
- Gerner P, Oettinger R, Gerner W, Falbrede J, Wirth S. (2000) Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Infect Dis J* 19: 1074-1077.
- Gimenez-Barcons M, Forn X, Ampurdanes S, Guilera M. (1999) Infection with a novel human DNA virus has no pathogenic significance in patients with liver diseases. *J Hepatol* 30: 1028-1034.
- Girard C, Ottomani L, Ducos J, Dereure O, Carles MJ, Guillot B. (2007) High Prevalence of Torque teno (TT) virus in classical Kaposi's sarcoma. *Acta Derm Venerol* 87(1): 14-17.
- Goto K, Sugiyama K, Ando T., Mizutani F, Teraba K, Tamaka K, Nishiyama M, Wade Y. (2000) Detection rates of TT virus DNA in serum of umbilical cord blood, breast milk and saliva. *Tohoku J Exp Med* 191: 203-207.
- Hafner GJ, Stafford MR, Wolter LC, Harding RH, Dale JL. (1997) Nicking and joining activity of banana bunchy top virus replication protein in vitro. *J Gen Virol* 78 : 1795-1799.

- Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. (1998) Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72: 5262-5267.
- Herold G. (Hrsg.) *Innere Medizin*, 2013; G. Herold Verlag
- Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. (1999) Complete circular DNA genomes of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 260: 17-22.
- Hino S. (2002) TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol* 12 (3): 151-158.
- Hsieh SY., Wu YH., Ho YP., Taso KC., Yeh KC., Liaaw YF. (1999) High prevalence of TT Virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan. *J Clin Microbiol* 37 (6): 1829-1831.
- Inami T, Konomi N, Arakawa Y. (2000) High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J Clin Microbiol* 38: 2407-2408.
- Itoh K, Takahashi M, Ukita M, Nishizawa T, Okamoto H. (1999) Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *J Inf Dis* 180: 1750-1751.
- Kamada K, Kamahora T, Kabat P. (2004) Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* 321: 341-348.
- Kamahora HT, Miyata S. (2000) Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Virol* 74: 9980-9986.
- Kato H, Mizokami M, Nakano T, Kondo Y. (1999) High prevalence and phylogenetic analysis of TT-virus infection in Mongolia. *Virus Res* 60: 171-179.
- Khudyakov YE, Cong ME, Nichols B, Reed D, Dou XG, Viazov SO, Chang J, Fried MW, Williams I. (2000) Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses. *J Virol* 74: 2990-3000.
- Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, Fukushi S, Mishiro S. (2000) Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol* 61: 165-170.

- Kodali VP, Gordon SC, Silverman AL, McCray DG. (1994) Cryptogenic liver disease in the United States: further evidence for non A-B and non C hepatitis. *Am J Gastroenterol* 89: 1836-1839.
- Kojima H, Kaita KD, Zhang M, Giulivi A, Minuk GY. (2003) Genomic analysis of a recently identified virus (SEN virus) and genotypes D and H by polymerase chain reaction. *Antiviral Res* 60 (1): 27-33.
- Koonin EV, Ilyina TV. (1993) Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *Biosystems* 30: 241-268.
- Kouyos RD, Rauch A, Böni J, Yerly S, Shah C, Aubert V, Klimkait T, Kovari H, Calmy A, Cavassini M, Battegay M, Vernazza PL, Bernasconi E, Ledergerber B, Günthard HF, Swiss HIV Cohort Study (SHCS). (2014) Clustering of HCV coinfections on HIV phylogeny indicates domestic and sexual transmission of HCV. *Int J Epidemiol* online: 43 (3): 887-896.
- Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushawar I. (1999a) Improved detection systems for TT-Virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol* 80: 2115-2120.
- Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushawar I. (1999b) Optimized PCR assay for the detection of TT virus. *J Virol Methods* 82: 109-112.
- Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Lefrere F, Kanfer A, Mariotti M, Lerable J, Thauvin M, Lefevre G, Rouger P, Girot R. (2000) Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. *Blood* 95: 347-351.
- Leppik L, Gunst K, Lehtinen M, Dillner J, Streker K, de Villiers EM. (2007) In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. *J Virol* 81: 9346-9356.
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science* Vol. 259 (5097) 946-951.
- Maggi F, Fornai C, Morrica A, Casula F, Vatteroni ML. (1999) High prevalence of TT-Virus viremia in italian patients, regardless of age, clinical diagnosis and previous interferon treatment. *J Infect Dis* 180 (3): 838-842.
- Maggi F, Pifferini M, Tempestini E. (2003) TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases. *J Virol*: 77 9081-9083 .
- Mankertz J, Buhk HJ, Blaess G, Mankertz A. (1998) Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* 16: 267-276.

- Mankertz A, Hattermann K, Ehlers B, Soike D. (2000) Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* 145: 2469-2480.
- Mariscal L, Lòpez-Alcorocho J, Rodríguez-Inigo E. (2002) TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 301: 121-129.
- Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Kihana T, Yano M, Mori T, Onji M. (2001) Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to neonatal transmission. *Hepato Res* 21: 280-287.
- Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. (1998) Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79: 2171-2179.
- Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Muramaki J, Kamahora T, Shiraki K Hino S. (1999) Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA Genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* 73: 3582-3586.
- Mohammed IS, Thabit AG, Abd-El Rahman SA, Abdelmohsen EE, Eldin SSS, AMA Ghandour. (2011) Prevalence of SEN Virus Infection in Multitransfused Patients in Assiut University Hospitals Egypt. *J Am Sci* 7 (1): 687-696.
- Moriyama M, Matsumara H, Shimuzu T, Shioda A, Kaneko M, Miyazawa K, Miyata H, Tanaka N, Uchida T, Arakawa Y. (2001) Histopathologic impact of TT virus infection on the liver of type C chronic hepatitis and liver cirrhoses in Japan. *J Med Virol* 64: 74-81.
- Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden SD, Halbur PG, Morgan MK, Yoon KJ, Paul PS. (1998) Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36: 2535-2541.
- Motayo BO, Akpa OM, Ezeani I, Faneye AO, Ud UA, Onoja B. (2014) Seroprevalence rates of Hepatitis C virus (HCV) antibody and Hepatitis B virus surface antigen (HBSAG) in blood donors in A, south-western, nigerian city. *J Immunoassay Immunochem*: Epub ahead of print 14 March; DOI: 10.1080/15321819.2014.899256.
- Mu SJ, Du J, Zhan LS, Wang HP, Chen R, Wang QL, Zhao WM. (2004) Prevalence of a newly identified SEN virus in China. *World J Gastroenterol* 10 (16): 2404-2405.

- Mushawar IK. (2000) Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J Med Virol* 62: 399-404.
- Nakano T, ParkYM, Mizokami M, Choi JC. (1999) TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Nakano Korea. *J Hepatol* 30: 389-393.
- Naoumov NV, Pertova EP, Thomas MG, Williams R. (1998) Presence of a newly described human virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 352: 195-197.
- Niagro FD, Forsthoefel AN, Lawther R, Kamalanathan L, Ritchie BW, Latimer KS, Lukert PD. (1998) Beak and feather virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminivirus and plant circovirus. *Arch Virol* 143: 1723-1744.
- Niel C, de Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M, Viazov S. (1999) High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol* 57: 259-263.
- Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S. (2005) Rolling-circle amplification of torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol* 86: 1343-1347.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1997) Novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 92-97.
- Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T. (1999) Quasispecies of TT-virus with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* 73: 9604-9608.
- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1998a) Molecular cloning and characterization of a novel DNA Virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 10: 1-16.
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. (1998b) Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 56: 128-132.
- Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, Takahashi M, Fukuda M, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999a) The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported and phylogenetic analysis. *Virology* 260: 17-22.

- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. (1999b) Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and non coding regions. *Virology* 259: 428-436.
- Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M. (1999c) A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* 42: 196-204.
- Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Kishimoto J, Sai T, Sugai Y (2000a) TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 700-707.
- Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, Kishimoto J, Hoshi Y, Mizuo H. (2000b) Circular double-stranded forms of TT-Virus DNA in the liver. *J Virol* 74: 5161-5167.
- Okamoto H, Fukuda M, Tawara A, Nishizawa T, Itoh Y, Hayasaka I, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. (2000c) Species-specific TT-Viruses and cross species infection in nonhuman primates. *J Virol* 74: 1132-1139.
- Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. (2000d) Sequestration of TT-Virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 74: 10236-10239.
- Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F, Yosikawa A. (2001) Heterogeneous distribution of TT-Virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* 288: 358-368.
- Ott C, Duret L, Chemin I, Trépo C, Mandrand B, Komurian-Pradel F. (2000) Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J Gen Virol* 81(Pt 12): 2949-2958.
- Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. (2002) Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol* 147: 21-41.
- Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, Browning GF. (2002) Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J Biol Chem* 277: 39566-39573.
- Phenix KV, Weston JH, Ypelaar I, Lavazza A, Smyth JA, Todd D, Wilcox GE, Raidal SR (2001) Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J Gen Virol* 82: 2805-2809.

- Pirovano S, Bellinzoni M, Ballerini C, Cariani E, Duse M, Albertini A, Imberti L. (2002) Transmission of SEN Virus from mother to their babies. *J Med Virol* 66: 421-427.
- Poovorawan Y, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Hirsch P. (2001) Transfusion transmissible virus TTV and its putative role in the etiology of liver disease. *Hepatogastroenterology* 48 (37): 256-60.
- Prescott LE, Simmonds P. (1998) Global distribution of transfusion-transmitted virus. *N Engl J Med* 339: 776-777.
- Prescott LE, MacDonald DM, Davidson F. (1999) Sequence diversity of TT-Virus in geographically dispersed human populations. *J Gen Virol* 80: 1751-1758.
- Primi D, Fiordalisi G, Mantero GL. inventors. Diasorin, SRL, assignee. Identification of SENV genotypes. International patent number WO0028039 (international application published under the patent cooperation treaty; <http://ep.espacenet.com/>. May 18, 2000).
- Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Gimenez-Barcons M, Sirera G, Tural C, Clotet B, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC, Martinez MA. (2000) Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 89-94.
- Rifai M. (2007) TT-Virusinfektion: Epidemiologie, Risikofaktoren und klinische Bedeutung bei polytransfundierte Patienten nach Herz-OP. Dissertation Universität München.
- Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW, Roggendorf M. (1999) Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol* 13: 181-184.
- Saback FL, Gomes SA, de Paula VS, da Silva RR, Lewis-Ximenez LL, Niel C. (1999) Age specific prevalence and transmission of TT virus. *J Med Virol* 59: 318-322.
- Saback F, Gomes S, Niel C. (2002) High frequent of mixed TT virus infections in healthy adults and children detected by a simplified heteroduplex mobility assay. *J Virol Methods* 101: 117-125.
- Safadi R, Or R, Ilan Y, Naparstek E, Nagler A, Klein A, Ketzinel-Gilaad M, Ergunay K, Danon D, Shouval D, Galun E. (2001) Lack of known hepatitis virus in hepatitis-associated aplastic anemia and outcome after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 27 (2): 183-90.

- Schreter I, Kristian P, Jarcuska P, Porubcin S, Siegfried L, Birosova E, Rajnic A, Gocalova A. (2006) Detection of SEN virus in the general population and different risk groups in Slovakia. *Folia Microbiol (Praha)* 51(3): 223-228.
- Schröter M, Polywka S, Zollner B, Schäfer P, Laufs R, Feucht HH. (2000) Detection of TT virus DNA and GB virus type C/Hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. *J Clin Microbiol* 38: 745-747.
- Schröter M, Laufs R, Zollner B, Knodler B, Schafer P, Sterneck M, Fischer L, Feucht HH. (2002) Prevalence of SENV-H viraemia among healthy subjects and individuals at risk for parenterally transmitted diseases in Germany. *J Viral Hepat* 9: 455-459.
- Serin MS, Tezcan S, Delialioglu N, Tiftik N, Aslan G, Emekdas G. (2006) Investigation of SEN virus genotypes D and H among blood donors in Mersin University Medical School Hospital. *Mikrobiyol Bul* 40 (1-2): 39-45.
- Shibata M, Wang RY, Yoshiba M, Shih JW, Alter HJ, Mitamura K. (2001) The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *J Infect Dis* 184: 400-404.
- Shimizu T, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. (2000) Persistent TTVirus infection does not contribute to the development of Non-A to -G hepatocellular carcinoma. *Intervirology* 43: 80-86.
- Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J, Jarvis LM. (1998) Detection of a novel DNA virus (TT virus) in blood donors and blood products. *Lancet* 352: 191-195.
- Springfeld C, Burgert J, Schnitzler P, Tobiasch E, Kehm R, Darai G. (2000) TT-Virus as a human pathogen: Significance and Problems. *Virus Genes* 2000; 20:1: 35-45.
- Stark K, Poggensee G, Höhne M, Bienzle U, Kiwelu I, Schreier E. (2000) Seroepidemiology of TT virus, GBC-C/HGV, and hepatitis viruses B, C, and E among women in a rural area of Tanzania. *J Med Virol* 62 (4): 524-530.
- Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Kawabe Y, Wada Y. (1999) Route of TT-Virus infection in children. *J Med Virol* 59: 204-207.
- Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F. (2001) Highly diverse TTV population in infants and their mothers. *Virus Res* 73 (2): 183-188.

- Sule WF, Kajogbola AT, Adewumi MO. (2013) High prevalence of anti-hepatitis A virus immunoglobulin G antibody among healthcare facility attendees in Osogbo, Nigeria. *J Immunoassay Immunochem* 34 (1): 75-82.
- Szladek G, Juhasz A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, Tar I, Márton I, Kónya J, Gergely L, Szarka K. (2005) High co-prevalence of genotype 1 TT Virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol* 58: 402-405.
- Takahashi K, Hoshimoto H, Ohta Y, Yoshida N, Mishiro S. (1998) Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatol Res* 12: 233-239.
- Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, Mishiro S. (2000a) Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology* 43: 119-123.
- Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, Mishiro S. (2000a) Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 145: 979-993.
- Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Nakano T, Kato T, Kato H, Mukaide M, Park YM, Kim BS, Ueda R. New genotypes of TT virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *FEBS Lett* 1998a; 437: 201-206
- Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T. (1998b) Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J Med Virol* 56: 234-238.
- Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Nakano T. (1999) A new genotype of TT virus infection among Colombian native Indians. *J Med Virol* 57: 264-268.
- Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Nakano T, Hayashi K, Kato T, Mukaide M, Iida S, Mizokami M. (2000) Identification of a novel 23 kDa protein encoded by putative open reading frame 2 of TT virus (TTV) genotype 1 different from the other genotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 837-841.
- Tanaka Y, Primi D, Wang RYH, Umemura T, Yeo AET, Mizokami M, Alter HJ, Shih JW. (2001a) Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *J Infect Dis* 183: 359-376.
- Tanaka T, Kuroda K, Kobayashi M. (2001b) Detection and typing of TT virus DNA genotype by the PCR-RFLP method. *Mol Cell Probes* 15: 195-200.

- Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. (1986) Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91: 271-276.
- Todd D, Weston JH, Soike D, Smyth JA. (2001) Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286: 354-62.
- Tsuda F, Okamoto H, Ukita M, Tanaka T. (1999) Determination of antibodies to TT-virus and application to blood donors and patients with post-transfusion non A-G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* 77: 199-206.
- Tsuda F, Takahashi M. (2001) IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection. *Hepatology* 19 (1): 1-11.
- Umemura T., Yeo A.E.T., Shih J., Matsumoto A., Orii K., Tanaka E. The presence of SEN Virus infection in Japanese patients with viral hepatitis and liver disease. *Hepatology* 2000; 32: 381 A
- UNAIDS (2012) HIV and AIDS estimates.
<http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/nigeria/>
 Letzter Zugriff: 3. Juli 2014
- Vaidya S, Chitambar S, Arankalle V. (2002) Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatol* 37: 131-136.
- Viazov S, Ross RS, Varenholz C, Lange R, Holtmann M, Niel C, Roggendorf M. (1998) Lack of evidence for an association between TTV infection and severe liver disease. *J Clin Virol* 11 (3): 183-187.
- de Villiers EM, Schmidt R, Delius H, zur Hausen H. (2002) Heterogeneity of TT virus –like sequences isolated from human tumour biopsies. *J Mol Med* 80: 40-50.
- Wang LY, Ho TY, Chen MC, Yi CS, Hu CT, Lin HH. (2007) Prevalence and determinants of SENV viremia among adolescents in an endemic area of chronic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 22 (2): 171-176.
- Worobey M. (2000) Extensive Homologous recombination among widely divergent TT viruses. *J Virol* 74: 7666-7670.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin I der Universität Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Doktor Bertram Flehmig durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Professor Doktor Bertram Flehmig in Zusammenarbeit mit Frau Doktor Sabine Schleicher (Betreuerin, Institut für Kinder und Jugendmedizin I der Universität Tübingen) .

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Doktor Schleicher von mir durchgeführt.

Die Synthetisierung der Anellovirus spezifischen Antikörper wurde von Herrn Doktor Hubert Kalbauer (naturwissenschaftlich medizinisches Institut der Universität Tübingen) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 09.02.2016

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor der Abteilung für Kinder und Jugendmedizin durchgeführt.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Bertram Flehmig für die Vergabe dieses interessanten Themas danken und die stets kompetente und wohlwollende Betreuung während der Ausarbeitung.

Ich danke ausserdem Frau Dr. Sabine Schleicher für die jahrelange Betreuung und zahlreichen Anregungen und Beratung im Verlauf der Laborarbeit und der Ausarbeitung der Dissertation.

Ich möchte zudem den Labormitarbeiterinnen für Ihre Hilfsbereitschaft meinen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt auch all derer, die Seren für diese Arbeit gewonnen und zur Verfügung gestellt haben. Hierzu gehört Herr Dr. Andreas Weimer der die nigerianischen Seren in Lagos gesammelt hat. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Dr. Isar vom staatlichen tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf danken für die Bereitstellung der Schweine und Rinderseren.

Dank auch an Dr. Hubert Kalbauer, naturwissenschaftlich medizinisches Institut der Universität Tübingen, der vier Peptide zum Nachweis der Anellovirus – spezifischen Antikörper synthetisiert hat.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name Ute Junker
Geburtsdatum/-ort 02.11.1978, Stuttgart (Deutschland)
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulischer Werdegang

1985 – 1989 Grundschule, Albschule Stuttgart-Degerloch
1989 – 1995 Wilhelmsgymnasium (Stuttgart-Degerloch)
1995 – 2000 Gymnasium Mildred-Scheel-Schule (Böblingen)
Abschluss Abitur

Universitärer Werdegang

2001 – 2003 Vorklinischer Abschnitt Medizinische Fakultät Tübingen
Abschluss mit der Ärztlichen Vorprüfung (04.04.2003)
2003 – 2007 Klinischer Abschnitt Medizinische Fakultät Tübingen
Abschluss mit dem Staatsexamen nach der neuen
Approbationsordnung (05.06.2007)

Famulaturen

09 – 10/2003 Allgemein und Viszeralchirurgie, Robert-Bosch-Krankenhaus,
Stuttgart
02 – 03/2004 Gynäkologie und Geburtshilfe, Robert-Bosch-Krankenhaus,
Stuttgart
09 – 10/2004 Allgemeinmedizinische Praxis, Stuttgart-Degerloch
03 – 04/2005 Innere Medizin/Nephrologie; Robert-Bosch-Krankenhaus,
Stuttgart
08/2005 Innere Medizin/Hämatologie und Onkologie, Marienhospital,
Stuttgart

Praktisches Jahr

02 – 06/2006 Radiologie und Strahlentherapie, Marienhospital Stuttgart
06 – 10/2006 Allgemein und Viszeralchirurgie, Marienhospital Stuttgart
10/2006 – 01/2007 Innere Medizin/Gastroenterologie, Pneumologie, Rheuma-
tologie, Marienhospital Stuttgart

Berufstätigkeit

11/2007 – 03/2012: Klinik für Kardiologie, Endokrinologie
und internistische Intensivmedizin
03/2012 – 03/2013: Klinik für Gastroenterologie, Hämato-
logie, Onkologie und Palliativmedizin
03/2013– 12/2014 : Klinik für Kardiologie, Endokrinologie
und internistische Intensivmedizin
seit 01/2015 : Oberärztin internistische
Intensivstation

Facharztanerkennung und Zusatzbezeichnungen

12/2011 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
10/2013 Fachärztin für Innere Medizin

