Nyctalus (N.F.), Berlin **16** (2011), Heft 3-4, S. 217-223

Pilotstudie zur Untersuchung einheimischer Fledermäuse auf das Vorkommen von Paramyxoviren

Von LINDA KWASNITSCHKA, Greifswald-Insel Riems, BERND OHLENDORF, Roßla, MARTIN GROSCHUP und ANNE BALKEMA-BUSCHMANN, Greifswald-Insel Riems

Mit 4 Abbildungen

Abstract

Pilot study to evaluate the presence of Paramyxoviruses in native bats

Bats and flying foxes may transmit a number of infectious agents that obviously do not induce disease in these animals. Flying foxes in Southeast Asia and in Western Africa have been identified to carry Nipah and Hendra virus. These viruses of the family Paramyxoviridae may cause fatal illness in humans. No reports are available on the presence of other representatives of the family of Paramyxoviridae with any or no pathogenic potential European bats.

Therefore we collected oral swab samples and, if spontaneously released, urine samples from animals representing different bat species collected at different locations in Saxonia-Anhalt during bat colony surveillance projects. These samples were analysed using laboratory diagnostic methods for the presence of Paramyxovirus-associated nucleic acid. Preliminary results point at the fact that indigenous bat species may carry and also shed Paramyxoviruses. Neither the bats nor any human individuals that were involved in the handling of the animals did display any signs of disease, therefore it can be concluded that a pathogenic potential of these viruses is absent or at least very low.

Zusammenfassung

Fledermäuse und Flughunde können eine Reihe von Krankheitserregern ausscheiden, die bei den Tieren selbst offensichtlich keine krankmachende Wirkung besitzen. So wurden Flughunde in Südostasien und in Westafrika als Träger von Nipah- und Hendraviren identifiziert. Diese Viren aus der Familie der Paramyxoviren können beim Menschen lebensbedrohliche Erkrankungen hervorrufen. Über das Vorhandensein von weiteren Vertretern dieser Virusfamilie mit oder ohne krankmachendem Potenzial bei europäischen Fledermäusen liegen bisher keine Berichte vor.

Daher wurden im Rahmen von Fledermaus-Fangaktionen an verschiedenen Lokalisationen in Sachsen-Anhalt und bei verschiedenen Fledermausspezies Maultupfer und, falls vorhanden, spontan abgesetzte Urinproben gesammelt. Diese Proben wurden mit labordiagnostischen Methoden auf das Vorhandensein von Paramyxovirus-assoziierter Nukleinsäure untersucht. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Individuen einiger Spezies einheimischer Fledermäuse Paramyxoviren tragen und ausscheiden können. Weder bei den Fledermäusen noch bei Personen, die im Rahmen der Fangaktionen direkten Kontakt zu den Tieren hatten, kam es zum Auftreten von Krankheitssymptomen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Viren kein oder zumindest nur ein äußerst geringes krankmachendes Potenzial aufweisen.

Keywords

Bat, Paramyxovirus, oral swabs, urine sample, PCR.

1 Einleitung

Fledertiere konnten als Träger verschiedener Erreger von lebensbedrohlichen hämorrhagischen Fiebererkrankungen des Menschen identifiziert werden, wie dem SARS-Coronavirus, dem Ebola- und dem Marburgvirus (POON et al. 2005, LEROY et al. 2005, TOWNER et al. 2007). Weitere von Flughunden übertragene Zoonose-Erreger, also Erreger, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden können, sind die Nipah- und Hendraviren der Gattung Henipavirus aus der Familie der Paramyxoviren (ENSERINK 2000, HALPIN et al. 1999, MCCORMACK 2005). Zu dieser Virusfamilie wird auch das Masern- und das Mumpsvirus des Menschen, das Staupevirus des Hundes und anderer Fleischfresser sowie das Newcastle Disease Virus des Hausgeflügels gezählt.

Hendravirus-Infektionen wurden erstmals 1994 in Australien in dem kleinen Ort Hendra in der Nähe von Brisbane beobachtet. Hier er-

krankten Pferde in einem Reitstall, der an eine Pferdeklinik angeschlossen ist, an einer schweren Atemwegsinfektion. Bei einigen Pferden verlief diese Infektion tödlich. Der Trainer einer der Pferde sowie ein behandelnder Tierarzt erkrankten kurz darauf an einer schweren Hirnentzündung und verstarben. Insgesamt wurden seitdem sechs weitere Hendra-Ausbrüche in Australien beobachtet. Dabei verstarben vier Menschen und mehr als 60 Pferde, davon mehr als 22 allein im Jahr 2011 (ProMed 2011).

Infektionen mit dem Nipahvirus wurden erstmals 1998 in Malaysia beobachtet. Zunächst erkrankten Schweine in größeren Schweinehaltungen an einem ungewöhnlich bellenden Husten. Einige der Tiere zeigten zentralnervöse Störungen. Wenige Zeit später wurden Fälle von Gehirnentzündungen bei Menschen festgestellt, die Kontakt zu diesen Schweinen hatten. Von den 238 festgestellten Nipahvirus-Erkrankungen bei Menschen in Malaysia verliefen 109 Infektionen tödlich. Untersuchungen zur Herkunft des Erregers und zu den möglichen Übertragungswegen identifizierten Flughunde der Gattung *Pteropus* als Virusreservoir. In unmittelbarer Nähe zu den Ausläufen der Schweine befanden sich Mangobäume, in denen die Flughunde übernachteten (LOOI & CHUA 2007, CHUA 2010). In Malaysia konnte die Infektion schon Ende 1999 gestoppt werden, allerdings kommt es seitdem regelmäßig zu Krankheitsfällen in Bangladesch und Indien. Untersuchungen von Urinproben von Flughunden ergaben, dass auch in Gebieten mit einer hohen Nipahvirus-Durchseuchung nur bei wenigen Tieren die Nukleinsäure des Erregers nachweisbar war; eine Erregeranzucht gelang in den seltensten Fällen (JOHARA et al. 2001, CHUA et al. 2002, WACHARAPLUESADEE et al. 2010). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von experimentellen Infektionen von Flughunden mit dem Nipahvirus: hier konnte gezeigt werden, dass die Tiere das Virus zwar vermehren, es dann aber nach nur kurzer Zeit zur Elimination des Virus kommt (MIDDLETON et al. 2007). Die Nukleinsäure des Virus ist nur für kurze Zeit und vor allem im Urin nachweisbar. Auch in der Blutbahn zirkulieren nur für relativ kurze Zeit nach der Infektion schützende Antikörper. Sehr ähnliche Beobachtungen wurden nach der experimentellen Infektion von Flughunden mit dem Hendravirus gemacht. Reproduktions- und Nahrungs-Stress bei den Tieren scheinen die Ausscheidung des Virus zu begünstigen. Dies konnte sowohl für das Hendravirus (PLOWRIGHT et al. 2008) als auch für das Nipahvirus gezeigt werden.

Natürliche Infektionen mit Nipah- und Hendraviren wurden bisher nahezu ausschließlich bei fruchtfressenden Flughunden (*Megachiroptera*) nachgewiesen. Eine Ausnahme hiervon bildet *Scotophilus kuhlii* (Kleine Gelbe Asien-Hausfledermaus) aus dem Stamm der *Nycticeiini*. Bei einem in Malaysia während des Nipah-Ausbruchs 1999 gefangenen Tier dieser Art konnten Antikörper gegen das Nipahvirus nachgewiesen werden (JOHARA et al. 2001). Dies illustriert, dass grundsätzlich auch insektenfressende Fledermäuse mit diesem Virus infizierbar sind. Um einen Einblick in die Häufigkeit des Vorkommens von Paramyxoviren in einheimischen europäischen Fledermäusen zu erhalten, wurden deshalb bei Fangaktionen in Sachsen-Anhalt Maultupfer- und, soweit möglich, Urinproben gesammelt und diese anschließend molekularbiologisch untersucht. In diesem Bericht werden die Ergebnisse einer Pilotstudie anhand von zwei Beprobungsaktionen in Fledermaus-Lokalpopulationen in Sachsen-Anhalt zusammengefasst.

2 Material und Methoden

2.1 Fangaktionen

Bei zwei Fangaktionen in Sachsen-Anhalt konnten Maultupfer- und, falls spontan abgesetzt, Urinproben von Fledermäusen gesammelt werden. Die erste Aktion fand am 22.05.2010 im Tiefland (99 m NN), im Naturschutzgebiet „Kreuzhorst“, in einem Fledermauskastengebiet im Auwald mit einem Altarm der Elbe, nahe Magdeburg, statt. Die zweite Aktion wurde am 15.01.2011 im FFH-Gebiet „Stollensysteme Büchenberg“, in

Abb. 1. Entnahme einer Maultupferprobe bei einer Großen Bartfledermaus (*Myotis brandtii*). Aufn.: R. MORITZ, Dresden, u. B. OHLENDORF, Roßla.
Fig. 1. Oral swab sampling from a *Myotis brandtii* bat.

Abb. 2. Entnahme einer Urintupferprobe bei einer Mückenfledermaus (*Pipistrellus pygmaeus*). Aufn.: R. MORITZ, Dresden, u. B. OHLENDORF, Roßla.
Fig. 2. Urine swab sampling from a *Pipistrellus pygmaeus* bat.

einem stillgelegten Bergwerk bei Elbingerode (Harz) bei 500 m NN, durchgeführt.

2.2 Erhebung individueller Tierdaten

Die Spezies aller gefangener Fledermäuse wurde bestimmt. Geschlecht, Alter, Unterarmlänge und Gewicht aller Tiere wurden erfasst. Zusätzlich wurden morphologische Besonderheiten, insbesondere die Zahnmerkmale der „Bartfledermausarten", notiert. Die Fledermäuse wurden mit einer Klammer der Fledermausmarkierungszentrale (FMZ) Dresden beringt. Fast alle der gefangenen Fledermäuse, also auch Wiedefunde, d. h. bereits markierte Individuen, wurden beprobt. In dem im Anschluss an diese Pilotstudie weitergeführten Monitoring sollen ebenfalls Wiederfunde gezielt beprobt werden, um so den zeitlichen Verlauf einer möglichen Infektion nachvollziehen zu können.

2.3 Probensammlung

Zur Sammlung der Maultupferproben wurden sehr feine Tupfer (Druswab™ Fine Tipp, MWE Medical Wire, Wiltshire, England) verwendet (Abb. 1). Sofort nach der Probennahme wurde der Tupfer in 500 ml Zellkulturmedium (MEM) mit Antibiotikazusatz (Baytril, Gentamycin, Lincospectin) gegeben und so bald wie möglich gekühlt. Die Urinproben wurden je nach abgesetzter Menge ebenfalls mit einem Tupfer aufgenommen (Abb. 2) und in MEM-Transportmedium gegeben oder direkt in ein 0,5-2,0 ml Probengefäß getropft.

2.4 Probenaufbereitung

Zur Vorbereitung des RNA-Nukleinsäurenachweises aus diesen Proben wurde unter Verwendung eines kommerziellen Kitsystems (QlAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen) die Gesamt-RNA aus der Probe isoliert.

2.5 Nachweis der Paramyxovirus-RNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die aufgereinigte RNA konnte nun in einer PCR-Reaktion eingesetzt werden, die zum Nachweis von RNA aus verschiedenen Paramyxoviren geeignet ist, z. B. auch für das Masernvirus des Menschen und das Staupevirus des Hundes (Tong et al. 2008). Bei diesem Ansatz musste eine PCR eingesetzt werden, die nicht spezifisch für eine bestimmte Art der Paramyxoviren ist, da nicht bekannt war, ob, und falls ja, welche Paramyxoviren in einheimischen Fledermäusen nachweisbar sein könnten. Das verwendete PCR-Protokoll führt zur Amplifikation eines 493 Basenpaar (bp) umfassenden Fragments aus dem L-Gen des Proteins, das für die RNA-Polymerase kodiert.

3 Ergebnisse

Bei der ersten Beprobung am 22.05.2010 im Naturschutzgebiet (NSG) „Kreuzhorst" konnten von 60 Tieren insgesamt 62 Proben gesammelt werden. Angetroffen wurden 120 Individuen aus fünf Fledermausarten (Abb. 3). Die Tiere wurden aus Fledermauskästen entnommen. Im Kastengebiet befinden sich insbesondere Reproduktionsgesellschaften der Mückenfledermaus (*Pipistrellus pygmaeus*), der Rauhhautfledermaus (*P. nathusii*) und der Großen Bartfledermaus (*Myotis brandtii*), welche autarke Gesellschaften sowie Mischgesellschaften bilden. Die Anzahl der angetroffenen reproduktiven Arten schwankt in den Kästen jährlich erheblich. Die am häufigsten beprobte Fledermausspezies war die Mückenfledermaus (*P. pygmaeus*).

Bei der zweiten Aktion am 15.01.2011 im Fauna-Flora-Habitat-Gebiet (FFH-Gebiet) „Stollensystem Büchenberg" bei Elbingerode (Harz) konnten von 84 Tieren 96 Proben gesammelt werden. Insgesamt wurden in dem Felsquartier 92 Fledermäuse aus 7 Arten festgestellt (Abb. 4). Während im Kastengebiet NSG „Kreuzhorst" fast ausschließlich Weibchen angetroffen werden, sind in den Harzer Felsquartieren regelmäßig mehr Männchen als Weibchen präsent. Die häufigste Fledermausart im FFH-Gebiet „Stollensystem Büchenberg" war zum Zeitpunkt der Beprobung die Kleine Bartfledermaus (*Myotis mystacinus*).

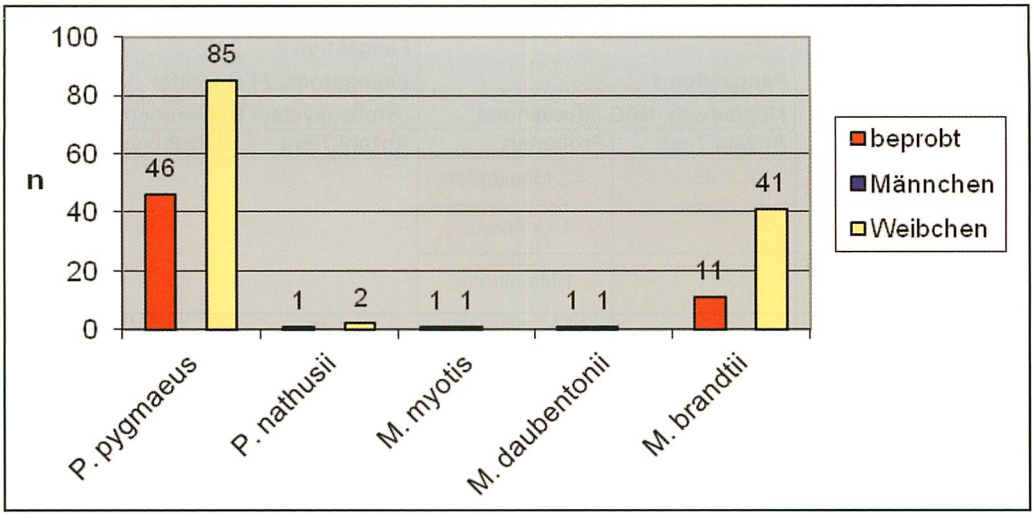

Abb. 3. Angetroffene und beprobte Fledermäuse im NSG "Kreuzhorst" bei Magdeburg am 22.05.2010.
Fig. 3. Numbers of bats that were present and that were sampled at the nature reserve „Kreuzhorst" near Magdeburg on the 22.05.2010.

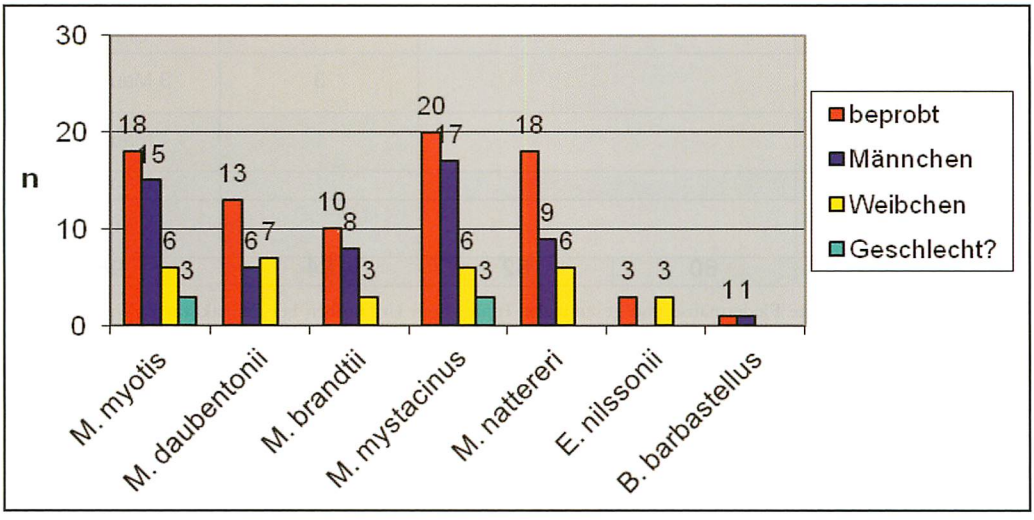

Abb. 4. Angetroffene und beprobte Fledermäuse im FFH-Gebiet "Stollensystem Büchenberg" bei Elbingerode am 15.01.2011.
Fig. 4. Numbers of bats present and sampled in the FFH area of „Büchenberg mine" near Elbingerode on the 15.01.2011.

Die beprobten Fledermäuse und die dabei gesammelten Proben sind in Tab. 1 im Detail aufgeführt.

Bei der Untersuchung der Proben mittels PCR konnte vereinzelt ein Paramyxovirus-spezifisches Produkt amplifiziert werden. Eine genaue Identifizierung kann erst erfolgen, wenn eine Virus-Anzucht und Vermehrung auf Zellkultur gelingt. Erste Untersuchungen hierzu laufen derzeit.

Die beiden gewählten Beprobungszeitpunkte während des Reproduktionszyklus einerseits und während des Winterschlafs andererseits dienten dem Ziel herauszufinden, ob die Tiere ein solches Virus möglicherweise ganzjährig tragen oder ob es, wie für den Fall

Tierart	Fangaktion 1 Magdeburg, NSG „Kreuzhorst“		Fangaktion 2 Elbingerode, FFH-Gebiet „Stollensystem Büchenberg“	
	Anzahl Tiere	Probenart	Anzahl Tiere	Probenart
Mückenfledermaus (*P. pygmaeus*)	46	46 Maultupfer		
		1 Urinprobe		
Rauhhautfledermaus (*P. nathusii*)	1	1 Maultupfer		
Großes Mausohr (*M. myotis*)	1	1 Maultupfer	18	16 Maultupfer
		1 Urinprobe		6 Urinprobe
Fransenfledermaus (*M. nattereri*)			18	17 Maultupfer
				2 Urinproben
Große Bartfledermaus (*M. brandtii*)	11	11 Maultupfer	10	10 Maultupfer
				1 Urinprobe
Kleine Bartfledermaus (*M. mystacinus*)			20	20 Maultupfer
				4 Urinproben
Wasserfledermaus (*M. daubentonii*)	1	1 Maultupfer	13	13 Maultupfer
				1 Urinprobe
Nordfledermaus (*E. nilssonii*)			3	3 Maultupfer
Mopsfledermaus (*B. barbastellus*)			1	1 Maultupfer
Braunes Langohr (*P. auritus*)			1	1 Maultupfer
				1 Urinprobe
Gesamt	**60**	**62**	**84**	**96**

Tabelle 1. Beprobte Fledermäuse und gesammelte Tupfer- und Urinproben bei Fangaktion 1 (Waldgebiet bei Magdeburg, Mai 2010) und Fangaktion 2 (Bergwerk Büchenberg, Febr. 2011).
Table 1. Summary of the sampled bats and the swab and urine samples collected during surveillance action 1 (wooded area near Magdeburg, May 2010) and action 2 (mine Büchenberg, February 2011).

der Henipaviren bei *Pteropus*-Flughunden, nur zu einer saisonalen Ausscheidung kommt. Ein deutlicher Unterschied zwischen der Nachweisrate im Sommer und im Winter würde darauf hindeuten, dass es auch bei diesen Paramyxoviren, wie für Henipavirus-infizierte Flughunde beschrieben, zu einer raschen Eliminierung des Virus kommt. Allerdings müsste diese Hypothese durch die Untersuchung der an einem einzigen Fangort und in derselben Kolonie einer Spezies gesammelten Proben geprüft werden.

4 Diskussion

Fledermäuse können vermutlich verschiedene Krankheitserreger, insbesondere Viren, tragen und vermehren, ohne selbst zu erkranken (Wong et al. 2007). Der Grund für die offensichtlich ausgezeichnete Abwehr dieser Tiere gegen die krankmachende Wirkung dieser Erreger ist bisher nicht bekannt und ist daher Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Paramyxoviren wie die Hendra- und Nipahviren wurden bisher ausschließlich bei Fledertieren in tropischen Ländern festgestellt. Im Zuge der Globalisierung, verbunden mit einer drastischen Erhöhung des Personen-, Tier- und Warenverkehrs und der intensiven Nutzung auch von entlegenen Ressourcen ist die Einschleppung solcher Erreger nach Europa zumindest theoretisch denkbar. Umso wichtiger ist es, die bereits heute bei einheimischen Fledermäusen vorkommenden viralen Infekti-

onserreger, z. B. auch aus der Familie der Paramyxoviren, kennen zu lernen und zu charakterisieren, von denen offensichtlich keinerlei Gefährdung für den Menschen ausgeht.

Die hier dargestellten Untersuchungen sind die Basis einer wissenschaftlich orientierten Bestandsaufnahme der gegenwärtigen Infektionssituation bei den Tieren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei einheimischen Fledermäusen Genabschnitte eines bisher nicht näher identifizierten Paramyxovirus nachgewiesen werden konnten. Es liegen keine Hinweise vor, dass dieses Virus eine krankmachende Wirkung für Mensch oder Tier besitzt. Weitergehende Analysen zu Verwandtschaftsverhältnisse dieses Virus zu anderen Virusfamilien, der geografischen und zoologischen Verbreitung und schließlich zur biologischen Bedeutung sind in Vorbereitung.

Dank

An den feldbiologischen Untersuchungen haben vom Arbeitskreis Fledermäuse Sachsen-Anhalt e. V. freundlicherweise mitgewirkt: MARCUS FRITZE, Roßla, HOLGER, KERSTIN und MARIA KRAEMER, Burg, NICOLE LIESS, Leipzig, NICOLE SONK, Dresden, und CHRISTINE TEUMER, Eisleben. Für die aktive Unterstützung beim Aufbau und bei der weiteren Durchführung eines Paramyxovirus-Monitorings möchten wir uns beim Ministerium für Landwirtschaft und Umwelt des Landes Sachsen-Anhalt bedanken.

Schrifttum

CHUA, K. B. (2010): Epidemiology, surveillance and control of Nipah virus infections in Malaysia. Malays. J. Pathol. **32**, 69-73.

-, KOH, C. L., HOOI, P. S., WEE, K. F., KHONG, J. H., CHUA, B. H., CHAN, Y. P., LIM, M. E., & LAM, S. K. (2002): Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. Microbes Infect. **4**, 145-151.

ENSERINK, M. (2000): Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. Science **289**, 518-519.

HALPIN, K., YOUNG, P. L., FIELD, H., & MACKENZIE, J. S. (1999): Newly discovered viruses of flying foxes. Vet. Microbiol. **68**, 83-87.

JOHARA, M. Y., FIELD, H., RASHDI, A. M., MORRISSY, C., VAN DER HEIDE, B., ROTA, P., BIN ADZHAR, A., WHITE, J., DANIELS, P., JAMALUDDIN, A., & KSIAZEK, T. (2001): Nipah virus infection in bats (order *Chiroptera*) in peninsular Malaysia. Emerg. Infect. Dis. **7**, 439-441.

LEROY, E. M., KUMULUNGUI, B., POURRUT, X., ROUQUET, P., HASSANIN, A., YABA, P., DELICAT, A., PAWESKA, J. T., GONZALEZ, J. P., & SWANEPOEL, R. (2005): Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. Nature **438**, 575-576.

LOOI, L. M., & CHUA, K. B. (2007): Lessons from the Nipah virus outbreak in Malaysia. Malays. J. Pathol. **29**, 63-67.

MCCORMACK, J. G. (2005): Hendra and Nipah viruses: new zoonotically-acquired human pathogens. Respir. Care Clin. N. Am. **11**, 59-66.

MIDDLETON, D. J., MORRISSY, C. J., VAN DER HEIDE, B. M., RUSSELL, G. M., BRAUN, M. A., WESTBURY, H. A., HALPIN, K., & DANIELS, P. W. (2007): Experimental Nipah virus infection in pteropid bats (*Pteropus poliocephalus*). J. Comp. Pathol. **136**, 266-272.

PLOWRIGHT, R. K., FIELD, H. E., DIVLIAN, A., PALMER, C., TABOR, G., DASZAK, P., & FOLEY. J. E. (2008): Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). Proc. Biol. Sci. **275**, 861-869.

POON, L. L., CHU, D. K., CHAN, K. H., WONG, O. K., ELLIS, T. M., LEUNG, Y. H., LAU, S. K., WOO, P. C., SUEN, K. Y., YUEN, K. Y., GUAN, Y., & PEIRIS, J. S. (2005): Identification of a novel coronavirus in bats. J. Virol. **79**, 2001-2009.

ProMed, 21.05.2010: Hendra Virus, equine – Australia (Queensland).

TONG, S., CHERN, S. W., LI, Y., PALLANSCH, M. A., & ANDERSON, L. J. (2008): Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. J. Clin. Microbiol. **46**, 2652-2658.

TOWNER, J. S., POURRUT, X., ALBARINO, C. G., NKOGUE, C. N., BIRD, B. H., GRARD, G., KSIAZEK, T. G., GONZALEZ, J. P., NICHOL, S. T., & LEROY, E. M. (2007): Marburg virus infection detected in a common African bat. PLoS One **2**:e764.

WACHARAPLUESADEE, S., BOONGIRD, K., WANGHONGSA, S., RATANASETYUTH, N., SUPAVONWONG, P., SAENGSEN, D., GONGAL, G. N., & HEMACHUDHA, T. (2010): A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in *Pteropus lylei* bats in Thailand: evidence for seasonal preference in disease transmission. Vector Borne Zoonotic Dis. **10**, 183-190.

WONG, S., LAU, S., WOO, P., & YUEN, K. Y. (2007): Bats as a continuing source of emerging infections in humans. Rev. Med. Virol. **17**, 67-91.

LINDA KWASNITSCHKA, MARTIN GROSCHUP & ANNE BALKEMA-BUSCHMANN, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Südufer 10, D- 17493 Greifswald-Insel Riems; E-Mail: linda.kwasnitschka@fli.bund.de; martin.groschup@fli.bund.de; anne.buschmann@fli.bund.de
BERND OHLENDORF, Landesreferenzstelle für Fledermausschutz Sachsen-Anhalt, Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Hallesche Straße 68a, D-06536 Südharz, OT Roßla; E-Mail: berndohlendorf@web.de