

Molekularbiologische Diagnostik von Parapockenerkrankungen

Molecular diagnostics of parapox virus infections

Bettina Töndury¹, Andreas Kühne¹, Heinz Kutzner², Gabriele Palmedo², Stephan Lautenschlager³, Siegfried Borelli³

(1) Dermatologische Klinik, Universitätsspital Zürich

(2) Dermatologische Gemeinschaftspraxis Friedrichshafen

(3) Dermatologisches Ambulatorium, Stadtspital Triemli Zürich

JDDG; 2010 · 8:681–685

Eingereicht: 5.2.2010 | Angenommen: 13.4.2010

Schlüsselwörter

- Parapocken
- Melkerknoten
- Ecthyma contagiosum (Orf)
- Polymerasekettenreaktion

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Diagnostik der Parapockenvirus-Erkrankungen stützt sich primär auf die Anamnese mit entsprechendem Tierkontakt. Die Klinik ist meist unspezifisch mit Auftreten von solitären nekrotisierenden Ulzerationen. Auch die Histologie zeigt oft unspezifische Befunde, vor allem wenn es sich um ältere Läsionen handelt. Die elektronenmikroskopische Negativkontrastierung zur Schnelldiagnostik für den (Para)-Pockenvirusnachweis steht nur in wenigen Zentren zur Verfügung und ist keine Routine-Methode. Die Serologie wird in Mitteleuropa ebenso wie der aufwendige und langwierige kulturelle Virusnachweis in der Routine kaum noch durchgeführt.

Patienten und Methodik: Am Beispiel des diagnostischen Vorgehens bei zwei Patienten mit Verdacht auf Orf bzw. Melkerknoten wird der Stellenwert der molekularbiologischen Diagnostik dargestellt. Neben der Bakteriologie, Viruskultur, Histologie und Elektronenmikroskopie (EM) wurde eine Orthopocken-, Parapocken und Orf-spezifische Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt.

Ergebnisse: Bei der einen Patientin mit anamnestisch und klinisch diagnostiziertem Ecthyma contagiosum fand sich eine negative PCR auf Para-, Orthopocken-, und Orfviren. Beim Patienten mit einem Melkerknoten konnte molekularbiologisch Parapockenvirus-DNA nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen: Die PCR zum Nachweis von Viren der Parapockengruppe stellt ein einfaches, schnelles und standardisiertes diagnostisches Instrument dar, welches überdies zwischen den Untergruppen der Parapoxviren unterscheiden kann. Sie erlaubt auch bei unklarer Anamnese und unspezifischer Klinik, den diagnostischen Nachweis einer Para- bzw. Orthopockenerkrankung zu führen. Eine einschränkende Voraussetzung stellt die Entnahme von Frischmaterial bzw. die Verwendung von neutral gepuffertem Formalin bei der PCR aus Paraffin-Blöcken dar.

Keywords

- parapoxvirus
- milker's nodule
- ecthyma contagiosum (Orf)
- polymerase chain reaction

Summary

Background: The diagnosis of parapox virus infections relies primarily on a history of contact with infected animals. The clinical presentation is usually a non-specific necrotic ulcer. The histology may also be non-specific, especially with older lesions. Negative-staining electron microscopy (EM) is a fast and reliable diagnostic tool, but is not widely available. Serological tests and the time-consuming viral culture are also rarely used in Europe.

Patients and methods: The diagnostic procedure in two patients with ecthyma contagiosum and milker's nodule using polymerase chain reaction specific for orthopox, parapox and Orf virus is explained. Diagnostics included bacterial culture, viral culture, histology and EM. In addition to these, a polymerase chain reaction (PCR) was performed in both cases.

Einführung

Infektionen durch Parapocken in Tierbeständen sind endemisch vorkommende Viruserkrankungen, welche bereits 1798 von Jenner beschrieben wurden. Sie können durch Schmierinfektion auf den Menschen übertragen werden. Die Zoonose äußert sich beim Menschen meist als Melkerknoten bei Übertragung des Pseudokuhpocken- oder Paravacciniavirus von Rindern oder als Ecthyma contagiosum (Orf) bei Übertragung des Orfvirus von Ziegen, Schafen und seltener von weiteren Huftieren wie Hirschen, Rentieren oder Kamelen. Die Viruserkrankung tritt bei Tieren als inapparente, lokale oder allgemeine Infektion in Erscheinung. Sie manifestiert sich an den Lippen (Lippengrind) als nässende, erythematöse Papulopusteln und Knoten, die mit Krusten überzogen sind [1]. Beim Menschen finden sich die Läsionen entsprechend des Kontakts vor allem an den Fingerstreckseiten und am Handrücken, seltener im Gesicht und zeigen einen stadienhaften Verlauf: erythematöse Papel, kokardenartige Läsion, exsudativer Knoten, trockener und verkrusteter Knoten, papillomatöse Plaque und Abheilung [1]. Sowohl das Pseudokuhpocken-Virus als auch das Orfvirus gehören dem Genus der Parapocken-Viren an, die der Familie der Pockenviren zugehörig sind (Tabelle 1). Bei entsprechender Anamnese mit Kontakt zu befallenen Tieren ist die klinische Verdachtsdiagnose einfach zu stellen. Das diagnostische Problem liegt jedoch vor allem bei fehlender typischer Anamnese in der Abgrenzung von anderen viralen und infektiösen Erkrankungen. Die histologische Untersuchung insbesondere in späteren Stadien ist oftmals unspezifisch und zeigt nur einen ulzerierenden Prozess. Weitere diagnostische Methoden wie Elektronenmikroskopie, Serologie und Viruskultur sind oft in der klinischen Routine nicht verfügbar. Die in solchen Fällen weiterführende molekulardiagnostische Diagnostik und ihre Gren-

Results: The patient with ecthyma contagiosum was negative for ortho-, parapox-, and orf-virus on PCR, whereas the patient with milker's nodule had a PCR positive for parapoxvirus.

Conclusions: PCR is a simple, fast, and standardized method of diagnosis that can distinguish between the subgroups of parapoxviruses. A diagnosis can be made even in cases of ambiguous history or unspecific clinical presentation. The method is limited by the necessity to sample native material or to use neutrally buffered formalin in case of PCR from paraffin material.

Tabelle 1: Human-pathologisch relevante Pockenviren.

Orthopoxvirus
Variolavirus
Vacciniavirus
Kuhpockenvirus
Katzenpockenvirus
Kaninchenpockenvirus
Mäusepockenvirus
Affenpockenvirus
Parapoxvirus
Orfvirus
Paravacciniavirus (Melkerknotenvirus, Pseudokuhpockenvirus)
Virus der pustulösen Stomatitis der Rinder
Molluscipoxvirus
Molluscum contagiosum Virus
Yatapoxvirus
Tanapoxvirus

zen werden im Folgenden am Beispiel zweier Patienten mit einer Parapockenviren-Infektion besprochen.

Patienten und Methoden

Patient 1

Anamnese: Bei einer 41-jährigen Hausfrau bestand seit einer Woche am Mittelfinger der linken Hand ein großengredienter Knoten mit randständigen Bläschen (Abbildung 1). Die Patientin hatte auf dem Hof eines befreundeten Bauern gearbeitet und dort Kontakt mit Schafen und Ziegen gehabt.

Differentialdiagnose: Es wurde die klinische Diagnose Orf (Ecthyma contagiosum) gestellt. Differentialdiagnostisch wurde eine Herpes-Infektion, ein Pyoderma gangraenosum, eine Pyodermie oder ein B-Zell-Lymphom erwogen.

Diagnostik: Bakteriologie und Viruskultur blieben negativ. Die Biopsie zeigte eine unspezifische Ulzeration. Material



Abbildung 1: Klinisches Bild: An Digitus III ein 1 cm messender Nodus mit zentraler Rötung, umgebendem weißem Ring und erythematöser Peripherie, einer Irisstruktur ähnlich.

zur molekulardiagnostischen Untersuchung mittels Polymerasekettenreaktion (Dr. med. H. Kutzner Dermatopathologische Gemeinschaftspraxis, Friedrichshafen, Deutschland) wurde entnommen.

Therapie und Verlauf: Eine Woche nach Vorstellung traten an den oberen Extremitäten neue erythematöse, targetoide Knoten entsprechend einem Erythema exsudativum multiforme (EEM) auf. Das Ecthyma contagiosum und das EEM heilten spontan ab.

Patient 2

Anamnese: Bei einem 25-jährigen Mann bestand seit vier Wochen am Ringfinger ein roter Knoten. Es war kein Trauma eruierbar. Zwei Tage vor Erstvorstellung kam es intermittierend zu Fieber (39°). Der Patient arbeitet als Pferdekutscher im Kanton Graubünden (Schweiz) und besitzt nebenberuflich eine Landwirtschaft mit Kühen.

Differentialdiagnose: Es wurden ein Ecthyma contagiosum, ein Melkerknoten, ein Panaritium und ein Granuloma teleangiectaticum erwogen.

Diagnostik: In der Abklärung wurde eine Bakteriologie entnommen und eine Elektronenmikroskopie des Bläscheninhalts (Elektronenmikroskopisches Zentrallaboratorium der Universität Zürich, Schweiz) durchgeführt. Dabei wurde ein Virus der Parapox-Gruppe identifiziert (Abbildung 2).

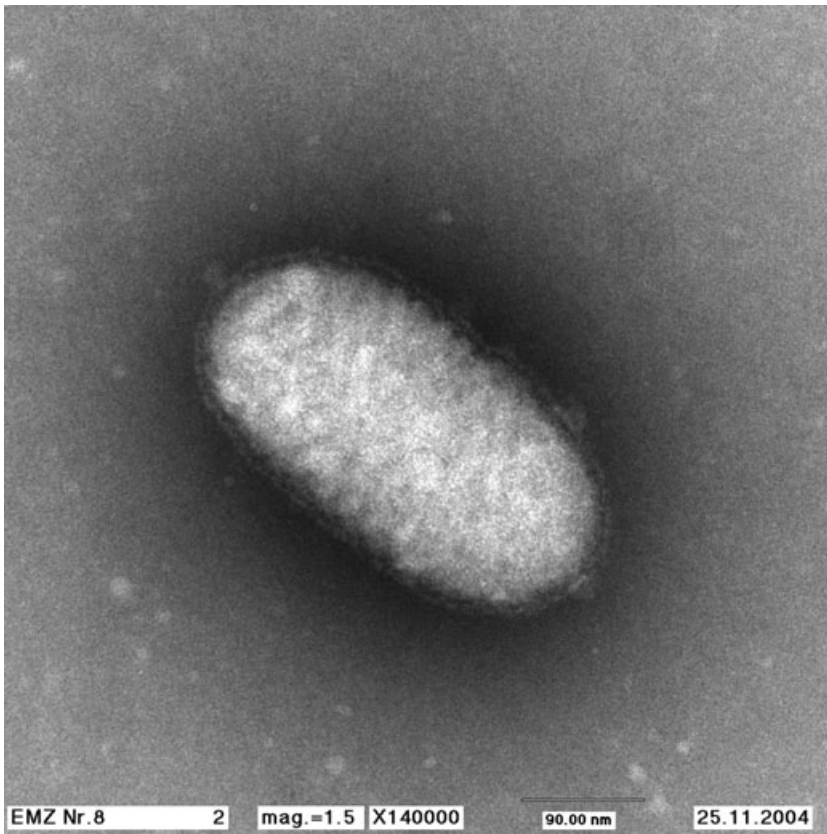


Abbildung 2: Elektronenmikroskopie: Virus der Parapox-Gruppe.

Es wurde ebenfalls eine PCR durchgeführt (Dr. med. H. Kutzner Dermatopathologische Gemeinschaftspraxis, Friedrichshafen, Deutschland).

Therapie und Verlauf: Der Finger wurde mittels Schiene ruhig gestellt. Topisch kamen desinfizierende Maßnahmen mit Kupfersulfat-Zink-Lösung 1:10 (Aqua d'Alibouri fortis) zum Einsatz und die Läsion heilte narbenfrei ab. Eine Lymphangitis im Rahmen einer bakteriellen Superinfektion wurde mit Clavulansäure und Amoxicillin, 1 g/d für 10 Tage behandelt.

Methodik der molekulargenetischen Diagnostik

DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung aus paraffineingebettetem, formalinfixiertem Gewebe wurden je nach Gewebegröße fünf bis zehn 10 µm dicke Paraffinschnitte eingesetzt. Nach der Entparaffinierung mit Xylol und Ethanol wurde das Gewebe über Nacht bei 55°C mit 0,6 mg Proteinase K verdaut und die DNA anschließend über eine Silikatmatrix gereinigt (QIAampDNA Mini Kit, Qiagen, Hilden). Die Probenkonzentration wurde auf 10 ng/µl eingestellt.

Polymerasekettenreaktion

Zum Nachweis von Pocken-DNA wurden pro Probe drei verschiedene PCR durchgeführt. Jeweils eine PCR zum Nachweis der beiden Großgruppen Orthopocken und Parapocken und eine spezifische PCR des zu den Parapocken gehörenden Orf-Virus. Hierfür wurden folgende Primer verwendet und die PCR unter untenstehenden Bedingungen durchgeführt:

Orf F: 5'-TACCAGCCAGAGGATC-TCC-3'

Orf R: 5'-AAAGTGTTTGACCG-CAAGGCCG-3'

PCR: 3 min. 94°C, anschließend 30 sec. 94°C, 30 sec. 65°C, 30 sec. 72°C für 45 Zyklen

Parapocken F: 5'-TTGGCGGCGT-CGTCGCGGCC-3'

Parapocken R: 5'-GACGCGCTGCT-GCGCGCGCC-3'

PCR: 3 min. 94°C, anschließend 30 sec. 94°C, 30 sec. 65°C, 30 sec. 72°C für 50 Zyklen

Orthopocken F: 5'-ACGTGGCAAA-CAATGTATA-3'

Orthopocken R: 5'-ACAATACTCTT-CCACTTTATA-3'

PCR: 3 min. 94°C, anschließend 30 sec. 94°C, 30 sec. 50°C, 30 sec. 72°C für 45 Zyklen

Die PCR erfolgte unter Zugabe von 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH=9,0, jeweils 200 mM dNTPs, 1,5 U Taq-Polymerase und jeweils 50 nmol/µl Primer in einem Endvolumen von 25 µl.

Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht visualisiert und fotografiert. Zur Bestimmung des Erregers wurden positive Ortho- bzw. Parapocken-PCR-Produkte aus dem Agarosegel eluiert (GFX DNA and gel band purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) und sequenziert (ThermoSequenase DNA sequencing kit für Alf express II, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Die erhaltene Sequenz und damit der Erreger wurde mittels eines Datenabgleichs (BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) identifiziert.

Ergebnisse

Bei der ersten Patientin war die PCR auf Parapocken und Orf-Virus-PCR sowie Orthopocken negativ. Beim zweiten Patienten wurde molekulargenetisch Parapockenviren-DNA nachgewiesen.

Die nachfolgende Sequenzierung erbrachte eine hundertprozentige Übereinstimmung zur Sequenz des Pseudokuhpocken-Virus.

Diskussion

Bei Personen die anamnestisch Kontakt mit Huftieren haben sowie eine Klinik mit nekrotisierenden Ulzerationen an den Fingern aufweisen, sollte an Erkrankungen mit humanpathogenen Pockenviren gedacht werden [2].

Die Diagnostik stützt sich dabei primär auf die Anamnese. Die Zoonosen werden beim Menschen entweder direkt durch kleine Hautverletzungen oder indirekt über Gegenstände übertragen [reviewed in 3]. Das Orf-Virus ist äußerst Temperatur resistent und bleibt über mehrere Monate an Messern, Zäunen und Futtertrögen kontagiös [reviewed in 3]. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde nie beschrieben. Infektionsquelle für den Melkerknoten sind durch Pseudokuhpocken infizierte Rinder, wobei die Erkrankung vor allem

Bauern betrifft. Das Ecthyma contagiosum betrifft ebenfalls in erster Linie Menschen mit regelmäßigem Tierkontakt wie Züchter und Tierärzte [4]. In der Literatur werden auch Fälle von Metzgern [5], Frauen die infiziertes Fleisch kochten [6] oder Infektionen während religiösen Opferfeiern im Islam, beim Fest Aid el Kebir [7, 8, 9] erwähnt.

Fehlen entsprechende anamnestische Hinweise und zeigt sich klinisch bereits eine ältere Läsion im Sinne einer nekrotisierenden Ulzeration kann die Diagnostik erschwert sein. Differentialdiagnostisch müssen Melkerknoten, Granuloma pyogenicum, Anthrax und Kuhpocken abgegrenzt werden [reviewed in 10].

Für die weiterführende Diagnostik bestehen verschiedene Möglichkeiten. Zur Schnelldiagnostik eignet sich die elektronenmikroskopische Negativkontrastierung [11]. Diese Methode steht jedoch nur noch in wenigen Zentren zur Verfügung und stellt keine Routine-Diagnostik dar. Die Probenentnahme und -verarbeitung können zu falsch negativen Resultaten führen [12].

Auch der serologische Antikörpernachweis gegen Parapockenviren ist in der Routinediagnostik meist nicht erhältlich. Die Serologie würde sich zwar als Verlaufsparemeter aufgrund der vor allem im späteren Krankheitsverlauf im Vergleich zur Elektronenmikroskopie höheren Sensitivität eignen [13, 14]. Ein Nachweis einer floriden Infektion kann jedoch vor allem bei Reaktivität infolge früherer Kontakte mit infizierten Tieren nicht erfolgen.

Bei der histologischen Untersuchung besteht das Problem des Entnahmepunktes der Biopsie, da der Befund in späteren Stadien unspezifisch wird. Auch bei frühzeitiger Entnahme können histologische Veränderungen, welche auf eine Virusinfektion hindeuten, namentlich Einschlusskörper und zytoplasmatische und nukleäre Vakuolisierung, leicht zu übersehen sein [15]. Die Viruskultur auf Amnionzellkulturen ist ein aufwändiges und langwieriges Verfahren, welches ebenfalls im klinischen Alltag kaum durchführbar ist [reviewed in 3].

Eine Möglichkeit zur differenzierten molekulargenetischen Diagnostik besteht mit der PCR, welche zwischen den Untergruppen der Parapoxviren unterscheidet kann [16, 17].

Die Pocken- und Parapockenfamilie eignet sich sehr gut für den PCR-Nachweis spezifischer Pocken-DNA. Mit jeweils einem Primer-Paar erfasst man die gesamte Ortho- bzw. Parapockenfamilie. Das positive PCR-Produkt wird in einem zweiten Arbeitsschritt sequenziert und das Ergebnis mit einer Datenbank abgeglichen. Damit erhält man die genaue Virus-Spezies in nur zwei Arbeitsschritten. Zudem lässt sich Pockenvirus DNA sowohl in Frischmaterial als auch in fixiertem Material, selbst in eingetrockneten Proben nachweisen.

Dadurch, dass sich die beiden Pockenvirus-Großgruppen mit jeweils nur einem Primer-Paar nachweisen lassen, wird die Suche nach Pockenviren sehr vereinfacht. Auch in der wiederholt beschriebenen Übertragung von Kuhpocken durch Katzen [18] hat die PCR wesentlichen Stellenwert [19].

Im ersten klinisch beschriebenen Fall ließ sich mittels PCR kein Virusnachweis führen. Aufgrund der eindeutigen Anamnese und Klinik wurde dennoch die Diagnose Orf gestellt. Fehlerquellen der PCR sind einerseits eine Überfixierung in Formalin, weshalb immer neutral gepuffertes Formalin verwendet werden sollte, da es bei Verwendung von nicht gepuffertem Formalin zur Säurebildung und dadurch zur Degradation der DNA kommt. Andererseits kann auch eine fehlerhafte Asservierung des Probenmaterials, wie z. B. die Wahl einer falschen Biopsiestelle bei einer zu alten Läsion, zu falsch negativen Resultaten führen. Echte falsch negative Befunde sind jedoch sehr selten [12]. Hingegen wird die Sensitivität der Methode wesentlich durch die Auswahl der Primer beeinflusst [20, 21]. Da bei der geschilderten Patientin gepuffertes Formalin verwendet wurde, die Biopsie ausreichend groß aus dem Übergang zwischen Randbereich und Mitte der klinisch floriden Läsion erfolgte, muss von einer echt falsch negativen PCR ausgegangen werden.

Bei aller zusätzlichen Information welche die molekulargenetische Diagnostik bedeuten kann bleibt jedoch die klinische Verdachtsdiagnose – bei solitären vor allem akral lokalisierten bullösen oder nekrotischen Ulzerationen an Erkrankungen mit Viren aus der Pocken/Parapocken-Gruppe zu denken – Grundvoraussetzung der nachfolgenden gezielten Untersuchungen. Wie jede

andere diagnostische Methode hat jedoch auch die molekulargenetische Diagnostik trotz ihrer hohen Sensitivität ihre Limitierungen wie sich am Beispiel des falsch negativen Resultates zeigt.

Interessenkonflikt

Es bestehen keine finanziellen oder persönlichen Beziehungen, die diese Arbeit verfälschen könnten. Es gibt keine Interessenkonflikte. <<<

Korrespondenzanschrift

Dr. med. Siegfried Borelli
Dermatologisches Ambulatorium
Stadtspital Triemli Zürich
Herman-Greulich-Str. 70
CH-8004 Zürich
Tel.: +41-44-2988920
Fax: +41-44-2988989
E-Mail: siegfried.borelli@triemli.stzh.ch

Literatur

- 1 Fölster-Holst R. Andere Viren in Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M. Dermatologie und Venerologie. 5. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005: 77.
- 2 Gill MJ, Arlette J, Buchan KA, Barber K. Human orf. A diagnostic consideration? Arch Dermatol 1990; 126: 356–358.
- 3 Bodnar MG, Miller OF III, Tyler WB. Facial Orf. J Am Acad Dermatol 1999; 40: 815–817.
- 4 Georgiades G, Katsarou A, Dimitroglou K. Human ORF (Ecthyma Contagiosum). J Hand Surg 2005; 30: 409–411.
- 5 Schimmer B, Sprenger HG, Wismans PJ, van Genderen PJ. Three patients with orf (ecthyma contagiosum). Ned Tijdschr Geneesk 2004; 148: 788–791.
- 6 Filosa G, Bugatti L, Nicolini M. Lésion vésiculo-bulleuse d'un doigt suivie d'une éruption disséminée. Ann Dermatol Venerol 2004; 131: 393–395.
- 7 Günes AT, Gezen C, Kapdagli H, Marschall HJ. Ecthyma-contagiosum-Epidemien in der Türkei. Hautarzt 1982; 33:384–387.
- 8 Ghislain PD, Dinet Y, Delescluse J. Orf in urban surroundings and religious practices: a study over a 3-year period. Ann Dermatol Venerol 2001; 28: 889–892.
- 9 Uzel M, Sasmaz S, Bakaris S, Cetinus E, Bilgic E, Karaoguz A, Ozkul A,

- Arican O. A viral infection of the hand commonly seen after the feast of sacrifice: human orf (orf of the hand). *Epidemiol Infect* 2005; 133: 653–657.
- 10 Al-Salam S, Nowotny N, Sohail MR, Kolodziejek J, Berger TG. Ecthyma contagiosum (Orf) – report of a human case from the United Arab Emirates and review of the literature. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 603–607.
- 11 Seifert HW, Saito Y. Ecthyma contagiosum mit Virusnachweis im negative-staining-Verfahren. *Hautarzt*. 1977; 28: 188–191.
- 12 Nitsche A, Gelderblom HR, Eisendle K, Romani N, Pauli G. Pitfalls in diagnosing human poxvirus infections. *J Clinical Virology* 2007; 38: 165–168.
- 13 Hartmann AA, Buttner M, Stanka F, Elsener P. Sero- and immunodiagnosis in parapoxvirus infections in the human. Milker's nodes, ecthyma contagiosum contact infection. *Hautarzt* 1985; 36: 663–669.
- 14 Yirrell DL, Vestey JP, Norval M. Immune responses of patients to orf virus infection. *Br J Dermatol* 1994; 130: 438–443.
- 15 Groves RW, Wilson-Jones E, MacDonald DM. Human orf and milker's nodule: A clinicopathologic study. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 706–711.
- 16 Torfason E, Gunadottir S. Polymerase chain reaction for laboratory diagnosis of orf virus infections. *J Clinical Virology* 2001; 24: 79–84.
- 17 Scagliarini A, Gallina L, Pozzo F, Battilani M, Ciulli S, Prosperi S, Pampiglione S. Diagnosis of orf virus infection in humans by the polymerase chain reaction. *The new Microbiologica* 2004; 27: 403–405.
- 18 Haenssle HA, Kiessling J, Kempf VA, Fuchs T, Neumann C, Emmert S. Orthopoxvirus infection transmitted by a domestic cat. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54: S1–4.
- 19 Bonnekoh B, Falk K, Reckling KF, Kenkies S, Nitsche A, Ghebremedhin B, Pokrywka A, Franke I, Thriene B, König W, Pauli G, Gollnick H. Cowpox infection transmitted from a domestic cat. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; 6: 210–213.
- 20 Kottaridi C, Momikou K, Lelli R, Markoulatos P, Mangana O. Laboratory diagnosis of contagious ecthyma: Comparison of different PCR protocols with virus isolation in cell culture. *J Virol Methods* 2006; 134:119–124
- 21 Nitsche A, Büttner M, Wilhelm S, Pauli G, Meyer H. Real-time PCR detection of parapoxvirus DNA. *Clin Chem* 2006 Feb; 52: 316–319.