

Aus der Abteilung Virologie
(Prof. Dr. med. F. Hufert)
Im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Entwicklung und Optimierung
eines Cytometric Bead Array zum Nachweis
von afrikanischen hämorrhagischen Fieberviren**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Tamara Nordmann
aus Köln

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hufert
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Pöhlmann
3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Virale hämorrhagische Fieber (VHF)</i>	1
1.2	<i>Hämorrhagische Fieberviren (HFV)</i>	3
1.2.1	Arenaviridae	5
1.2.1.1	Lassa-Virus (LASV)	5
1.2.1.2	Genom und Strukturaufbau der Arenaviridae	5
1.2.2	Bunyaviridae	7
1.2.2.1	Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV)	7
1.2.2.2	Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV)	7
1.2.2.3	Genom und Strukturaufbau der Bunyaviridae.....	8
1.2.3	Flaviviridae.....	10
1.2.3.1	Gelbfieber-Virus (YFV).....	10
1.2.3.2	Dengue-Virus (DENV)	10
1.2.3.3	Genom und Strukturaufbau der Flaviviridae	12
1.2.4	Filoviridae	13
1.2.4.1	Ebola-Virus (EBOV).....	13
1.2.4.2	Marburg-Virus (MARV).....	14
1.2.4.3	Genom und Strukturaufbau der Filoviridae	15
1.3	<i>Bestehende Diagnostikverfahren für hämorrhagische Fieberviren</i>	16
1.4	<i>Cytometric Bead Array (CBA)</i>	18
1.4.1	Aufbau und Prinzip des Durchflusszytometers	18
1.4.2	Der <i>Cytometric Bead Array</i>	19
1.5	<i>Zielsetzung und Fragestellung</i>	22
2	Material und Methoden	23
2.1	<i>Material</i>	23
2.1.1	Verbrauchsmaterial	23
2.1.2	Geräte	24
2.1.3	Chemikalien	25
2.1.4	Lösungen, Medien und Puffer	25
2.1.5	Reagenzienansätze	26
2.1.6	Ausgangs-RNS	26
2.1.7	Oligonukleotide	28
2.1.8	Verwendete Computerprogramme.....	30
2.2	<i>Methoden</i>	31
2.2.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	31
2.2.1.1	RNS-Extraktion	31
2.2.1.2	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung	32
2.2.1.3	PCR-Amplifikation	32

2.2.1.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.1.3.2	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	34
2.2.1.3.3	Multiplex-RT-PCR	35
2.2.1.3.4	Primer- und Sondendesign	37
2.2.1.3.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS	38
2.2.1.3.6	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	39
2.2.2	<i>Cytometric Bead Array (CBA)</i>	42
2.2.2.1	Aufreinigung der PCR-Produkte mit MinElute-Purifikation-Kit	42
2.2.2.2	Kopplung von Sonden an carboxylierte Beads	43
2.2.2.3	Hybridisierung an Beads und Detektion	44
3	Ergebnisse	46
3.1	<i>Amplifikation des Virusgenoms mittels PCR</i>	46
3.1.1	Bestimmung der optimalen Primerkonzentration	46
3.1.2	Bestimmung der optimalen Primerkombination	48
3.1.3	Vergleich der Primerdimerbildung in den Primermischungen	51
3.1.4	Bestimmung des optimalen Primerverhältnisses	52
3.1.5	Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem MinElute-Purifikation-Kit	55
3.2	<i>Kopplung der Sonde an Beads</i>	56
3.2.1	Reproduzierbarkeit der Kopplung	59
3.3	<i>Hybridisierung an bead-gekoppelte Sonden und Detektion</i>	59
3.3.1	Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	60
3.3.1.1	Optimierung der Hybridisierungstemperatur	60
3.3.1.2	Bedeutung der Lagerungsbedingungen der Beads für die Hybridisierung	61
3.3.1.3	Notwendigkeit des BSA-Puffers	62
3.3.2	Qualitativer Beweis im Uniplex-Hybridisierungsverfahren	63
3.3.3	Qualitativer Beweis im Multiplex-Hybridisierungsverfahren	65
3.3.4	Sensitivitätsmessung im Uniplex-Hybridisierungsverfahren	70
3.3.5	Sensitivitätsmessung im Multiplex-Hybridisierungsverfahren	73
3.3.6	Analyse der Ergebnisse und Grenzwertbestimmung	76
3.3.7	Kreuzreaktionstestung im Multiplex-Hybridisierungsverfahren	80
3.4	<i>Vergleich der Sensitivität der verschiedenen Nachweisverfahren für hämorrhagische Fiebertypen</i>	81
4	Diskussion	83
4.1	<i>Ausblick</i>	98
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	101

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BP	Mikrokugelpopulation (engl.: <i>beadpopulation</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
BSL	Biosicherheitsstufe (engl.: <i>biosafety level</i>)
C	Cytosin
CBA	zytometrischer Kugel-Test (engl.: <i>cytometric bead array</i>)
CCHF	Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber (engl.: <i>crimean-congo-hemorrhagic-fever</i>)
CCHFV	Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (engl.: <i>crimean-congo-hemorrhagic-fever-virus</i>)
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
COOH	Carboxyl
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
Ct	Zyklusschwellenwert (engl.: <i>cycle threshold</i>)
Cy	Carbocyanin
Da	Dalton
DEN	Dengue-Fieber
DENV	Dengue-Virus
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DHF	hämorrhagisches Dengue-Fieber
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
ds	Doppelstrang- (engl.: <i>double-stranded</i>)
DSS	Dengue-Schock-Syndrom
EBO	Ebola-Fieber
EBOVS	Ebola-Sudan-Virus
EBOVZ	Ebola-Zaire-Virus
EDAC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FP	Vorwärtsprimer (engl.: <i>forward-primer</i>)
G	Guanin
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung
GP	Glykoprotein
HF	hämorrhagische Fieber
HFV	hämorrhagische Fieberviren
Ig	Immunglobulin
JOS	Josiah (Stamm des LASV)
kA	keine Angabe
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LAS	Lassa-Fieber
LASV	Lassa-Virus
LNA	verbrückte Nukleinsäure (engl.: <i>locked nucleic acid</i>)
LOD	Detektionsgrenzwert (engl.: <i>limit of detection</i>)

Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MAR	Marburg-Fieber
MARV	Marburg-Virus
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
μ	Mikro-
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
n	Probenanzahl
n.d.	nicht determiniert
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
NK	Negativkontrolle
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nicht-Struktur-Protein
nt	Nukleotide
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>quantitative real-time-polymerase-chain-reaction</i>)
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNS	Ribonukleinsäure

RP	Rückwärtsprimer (engl.: <i>reverse-primer</i>)
RT	Reverse Transkriptase
RVF	Rift-Tal-Fieber (engl.: <i>rift valley fever</i>)
RVFV	Rift-Tal-Fieber-Virus (engl.: <i>rift valley fever virus</i>)
SARPE	Streptavidin-R-Phycoerythrin
SD	Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SM	SkimMilk (engl.: <i>skimmed milk</i> , deut.: Magermilch)
ss	Einzelstrang- (engl.: <i>single-stranded</i>)
T	Thymin
T _a	Renaturierungstemperatur (engl.: <i>annealing temperature</i>)
T _m	Schmelztemperatur (engl.: <i>melting temperature</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VHF	virale hämorrhagische Fieber
VP	virales Protein
w/v	Gewichtsverhältnis (weight/volume)
YF	Gelbfieber (engl.: <i>yellow fever</i>)
YFV	Gelbfieber-Virus

Alle chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt.

1 Einleitung

1.1 Virale hämorrhagische Fieber (VHF)

Der Sammelbegriff „Virale hämorrhagische Fieber“ (VHF) bezeichnet eine Gruppe infektiöser Fiebererkrankungen, die in schweren Fällen zu generalisierten Hämorrhagien führen können.

Klinische Manifestationen der VHF sind unspezifisch und zeigen eine große Vielfalt. Typischerweise können die Symptome in eine frühe und späte Phase unterteilt werden. In der frühen Phase der Infektion treten Fieber, Hypotension, Bradykardie, Tachypnoe, Konjunktivitis, Pharyngitis und ein Exanthem, das stark variieren kann, auf. Spätere Zeichen sind eine progressive hämorrhagische Diathese, Schleimhaut- und Konjunktivalhämorrhagien, Hämaturie, Hämatoemesis und Melena, intravaskuläre Koagulation und Schock. Die zentralnervöse Beteiligung manifestiert sich durch Konvulsionen, Delirium oder Koma und geht mit einer schlechten Prognose einher.

Die Erreger der VHF gehören zu 4 verschiedenen Virusfamilien, die alle einsträngige RNS-Genome besitzen: Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae und Flaviviridae. Zur Übertragung auf den Menschen kommt es meist durch Kontakt mit kontaminierten tierischen Reservoirs (z.B. Nagetiere) oder durch Vektoren (z.B. Stechmücken, Zecken). Vom Lassa-Virus (LASV) ist bekannt, dass es den Menschen sogar durch kontaminierte Exkremente von Tieren infizieren kann (McCormick et al. 1987). Die natürlichen Reservoirs und Vektoren von Ebola-Virus (EBOV) und Marburg-Virus (MARV) sind unbekannt, doch es sind Viren in Fruchtfledermäusen (*Rousettus aegypticus*) in Afrika nachgewiesen worden (Towner et al. 2009). Mit Ausnahme von Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) und allen Flaviviren können hämorrhagische Fiebertypen (HFV) auch direkt von Mensch zu Mensch übertragen werden, was zu nosokomialen Infektionen und Ausbrüchen führen kann. Die Inkubationszeit beträgt einige Tage (z.B. Gelbfieber: 3-6 Tage) bis Wochen (z.B. Ebola-Fieber: 2 Tage - 3 Wochen).

Die HFV können geographisch gut umschrieben werden. Die meisten HFV beschränken sich auf Afrika, Südamerika und Asien. Lediglich das Krim-Kongo-Hämorrhagische-Fieber-Virus (CCHFV) ist auch in Europa endemisch.

Das klinische und epidemiologische Wissen über VHF ist spärlich. Aufgrund ihrer hohen Morbidität und Mortalität haben die VHF zwar beträchtliche Aufmerksamkeit in den Medien erhalten, dennoch kommt es nur sporadisch zu Ausbrüchen von VHF.

Die letzten größeren VHF-Ausbrüche waren im Dezember 2008 bis Januar 2009 ein Ausbruch des Ebola-Zaire-Virus (EBOVZ) in der Demokratischen Republik Kongo (32 Personen, 12 Tote)(WHO 2009a) und im Februar 2010 ein RVF-Ausbruch in Südafrika (172 Personen, 15 Tote)(CDC 2011).

Durch die erhöhte Anzahl von Flugreisenden werden die HFV sporadisch von endemischen Gebieten nach Europa und Nordamerika exportiert. So wurde z.B. das MARV im Jahr 2008 von zwei Personen aus Uganda in die Niederlande und die Vereinigten Staaten von Amerika exportiert (Timen et al. 2009).

Der Verdacht auf VHF besteht bei allen Patienten, die schwer erkrankt sind und vaskuläre Symptome aufweisen, nachdem sie sich in einem HFV-endemischen Gebiet aufgehalten haben oder sie auf andere Weise in Kontakt mit dem Virus gekommen sind (z.B. Kontakt zu einer mit HFV infizierten Person oder Tieren bzw. Kadavern). Zur endgültigen Diagnose dienen die Virusisolation oder die IgM- / IgG-Antikörperbestimmung durch einen *enzym-linked immunosorbent-assay* (ELISA) und die Antigendetektion durch einen gegen virale Antigene gerichteten ELISA (engl: *antigen-capture ELISA*). Soll ein direkter Nachweis des Virusgenoms vorgenommen werden, können die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) oder die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet werden.

Die Hauptaufgabe der Behandlung von VHF ist die kreislaufunterstützende Therapie. Es sollte ein ausgeglichener Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt erhalten bleiben und für ein ausreichendes Zirkulationsvolumen und einen stabilen Blutdruck gesorgt werden. Zusätzlich muss die Verabreichung von Vasopressoren, antiinflammatorisch wirksamen Medikamenten und Antikoagulationen in Erwägung gezogen werden. Die Anwendung von künstlicher Beatmung und renaler Dialyse kann notwendig sein (Jahrling 1989). Bisher ist

kein antivirales Medikament von der „US Food and Drug Administration“ (FDA) zur Therapie von VHF bestätigt worden. Nur Ribavirin, ein Nukleosidanalogen, wird zur Therapie und Prophylaxe bei Arenaviren und Bunyaviren empfohlen (Bray,Huggins 1998, Bray,Paragas 2002, EMEA 2002). Ein Effekt von Ribavirin auf Filoviridae und Flaviviridae ist nicht bekannt. Durch eine Kombination mit Interferon-alpha könnte möglicherweise die Schutzwirkung von Ribavirin verstärkt werden (Bray,Paragas 2002).

Abgesehen von der 17D-Impfung, die höchsteffektiv gegen YFV wirkt, gibt es keinen zugelassenen VHF-Impfstoff. Potentiellen Impfstoffe für RVFV, EBOV, MARV und LASV befinden sich im experimentellen Stadium (EMEA 2002, NIH 2002).

Die meisten HFV erfüllen die Hauptkriterien, die von der „Working Group on Civilian Biodefense“ entwickelt wurden, um biologische Stoffe auf ihr Risiko als biologische Kampfstoffe missbraucht zu werden, einzuschätzen: (1) hohe Mortalität und Morbidität, (2) potentielle Mensch-zu-Mensch-Übertragung, (3) hohe Infektiosität bei Aerosolübertragung, (4) keine effektive Impfung vorhanden oder nur begrenzt verfügbar und (5) Möglichkeit zur Produktion in großen Mengen. Aufgrund dieser Kriterien geht laut der „Working Group on Civilian Biodefense“ ein besonderes Risiko von EBOV, MARV, LASV, RVFV, YFV, Omsk-Hämorrhagisches-Fieber-Virus und Kyasanur-Forest-Fieber-Virus aus (Borio et al. 2002).

1.2 Hämorrhagische Fieberviren (HFV)

Die Erreger des viralen hämorrhagischen Fiebers gehören zu vier verschiedenen Virusfamilien: den Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae und Flaviviridae. Die Viren weisen unterschiedliche Replikationsmechanismen, Epidemiologie und Interaktionen mit dem Wirt auf. Da die Arbeit mit HFV eine Einrichtung der Sicherheitsstufe BSL3 bis BSL4 und gut ausgebildetes Laborpersonal verlangt, ist das Wissen über molekulare Eigenschaften und Pathogenese der Viren sehr begrenzt. Die Diagnostik für VHF muss zeitnah erfolgen, damit VHF-Fälle früh isoliert und behandelt werden können. Nur mit Hilfe von Schnelldiagnostik können große Ausbrüche eines VHF verhindert werden.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein CBA zur Diagnostik der acht wichtigsten afrikanischen HFV entwickelt. Diese sind das Lassa-Virus (Arenaviridae), das Krim-Kongo-Virus, das Rift-Valley-Fever-Virus (Bunyaviridae), das Ebola-Sudan-Virus, das Ebola-Zaire-

Virus, das Marburg-Virus (Filoviridae), das Dengue-Virus und das Gelbfieber-Virus (Flaviviridae).

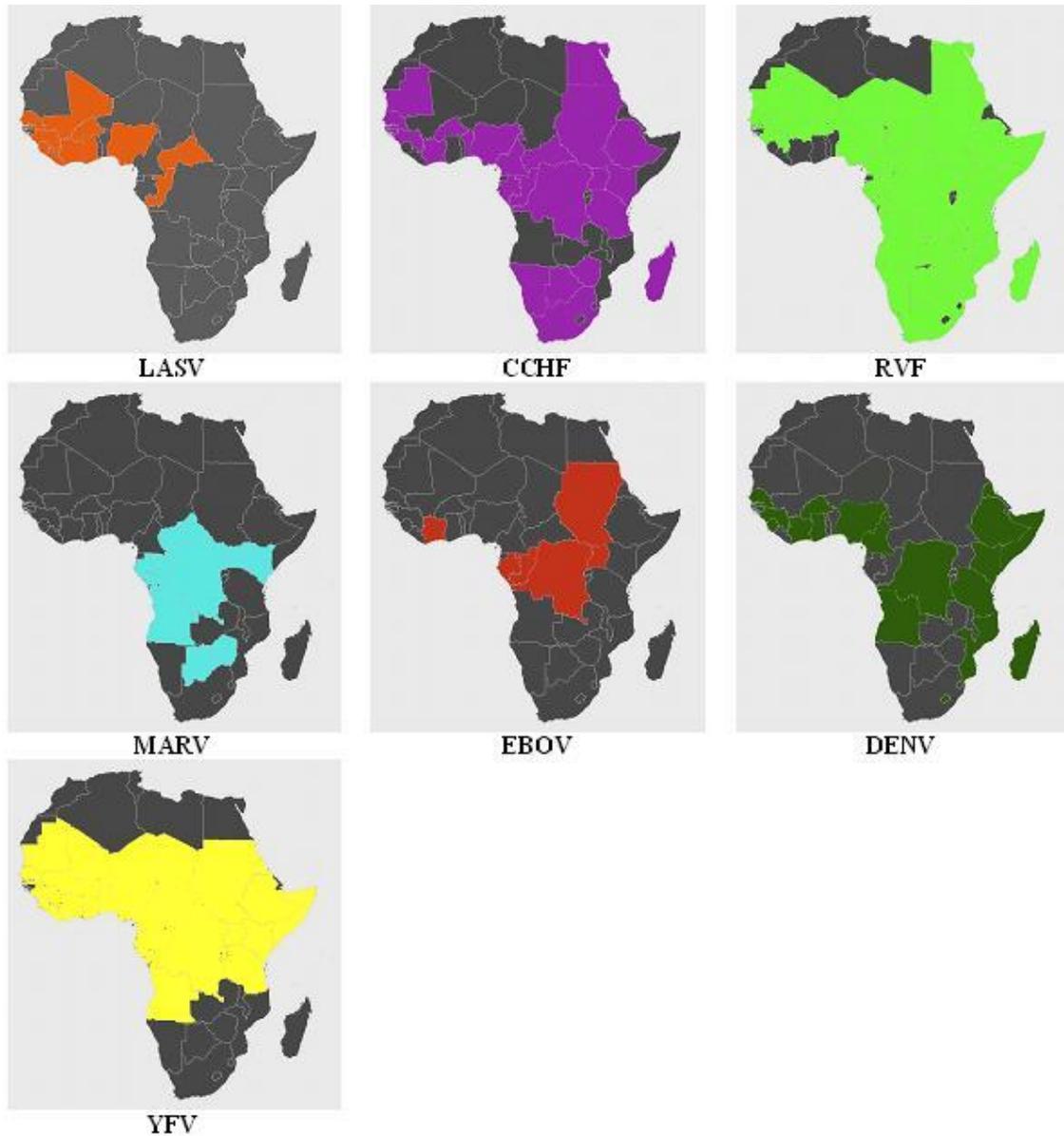


Abb. 1.1: **Epidemiologie der HFV in Afrika** dargestellt wird die dokumentierte Lokalisation von Ausbrüchen und der serologische Nachweis der HFV (CDC 2011, GlobalIncidentMap.com 2011, McCormick et al. 1999, WHO 2011).

1.2.1 Arenaviridae

1.2.1.1 Lassa-Virus (LASV)

Das Lassa-Virus wurde erstmalig 1970 von Frame (Frame et al. 1970) beschrieben und konnte im selben Jahr von Buckley und Casals isoliert werden (Buckley,Casals 1970). Das LASV gehört zu der Familie der Arenaviridae und wird der biologischen Sicherheitsstufe 4 zugeordnet. LASV ist in West-Afrika endemisch und wird in vier Subtypen unterteilt: Typ Nigeria und Typ LP (beide aus Nigeria) (Clegg et al. 1991, Demby et al. 1994, Ter Meulen et al. 1998), Typ Josiah (Sierra Leone)(Auperin,McCormick 1989) und Typ AV (Ghana, Côte D'Ivoire, Burkina Faso)(Gunther et al. 2000). Einige Studien schätzen, dass in Westafrika LASV jährlich 300.000 bis 500.000 Erkrankungen und bis zu 5000 Todesfälle verursacht (Ogbu et al. 2007).

Das Lassa-Fieber ist eine Zoonose, dh. als natürliche Reservoirs dienen den Lassa-Viren Nagetiere (*Mastomys natalensis*). Menschen können sich durch Inhalation von Aerosolen von Nagetierurin, durch Verdauung von durch Nagetiere kontaminiertem Essen oder durch direkten Kontakt mit Nagetierexkrementen infizieren (McCormick et al. 1987). Nosokomiale Transmissionen oder die direkte Mensch-zu-Mensch-Übertragung sind bei Lassa-Fieber ebenfalls aufgetreten (Mertens et al. 1973). 80% der infizierten Menschen bleiben asymptomatisch (WHO 2005a). In den übrigen 20% der Fälle tritt eine schwere systemische Erkrankung ein, die vor allem Leber, Niere und Milz betrifft. Die Mortalität liegt bei 15-20% (Monath et al. 1973). Die Inkubationszeit kann 3 bis 21 Tage betragen (Gunther et al. 2000). Als effektive Therapie hat sich Ribavirin bei Gabe im frühen Stadium erwiesen (Jahrling et al. 1980). Unterstützende Therapie ist oft nötig und beinhaltet Flüssigkeitsgabe, Bluttransfusionen, Chinin und Breitspektrumantibiotika (Holmes et al. 1990).

1.2.1.2 Genom und Strukturaufbau der Arenaviridae

Die Partikel der Arenaviridae haben eine sphärische Form mit einem Durchmesser, der zwischen 50 bis 300 nm variiert. Das Genom der Arenaviridae besteht aus zwei Segmenten einzelsträngiger RNS, die sogenannten L- (engl.: *large*) und S-Segmente (engl.: *small*). Zusammen ergeben sie eine Gesamtlänge von 3,4-7 kB. Das S-Segment

kodiert für das Vorläuferprotein GPC (Glycoprotein Precursor) der G1- und G2-Proteine (Glycoproteine) in positiver Orientierung und für das NP-Protein (Nukleoprotein) in negativer Orientierung. Das L-Segment besteht aus zwei Sequenzen in Ambisense-Orientierung. So wird an der 3'-Region in negativer Orientierung das L-Protein, die virale Polymerase (Gunther et al. 2000), kodiert und an der 5'-Region das Z-Protein, ein Zn^{2+} -Ionen bindendes Polypeptid. (s. Abb. 1.2)

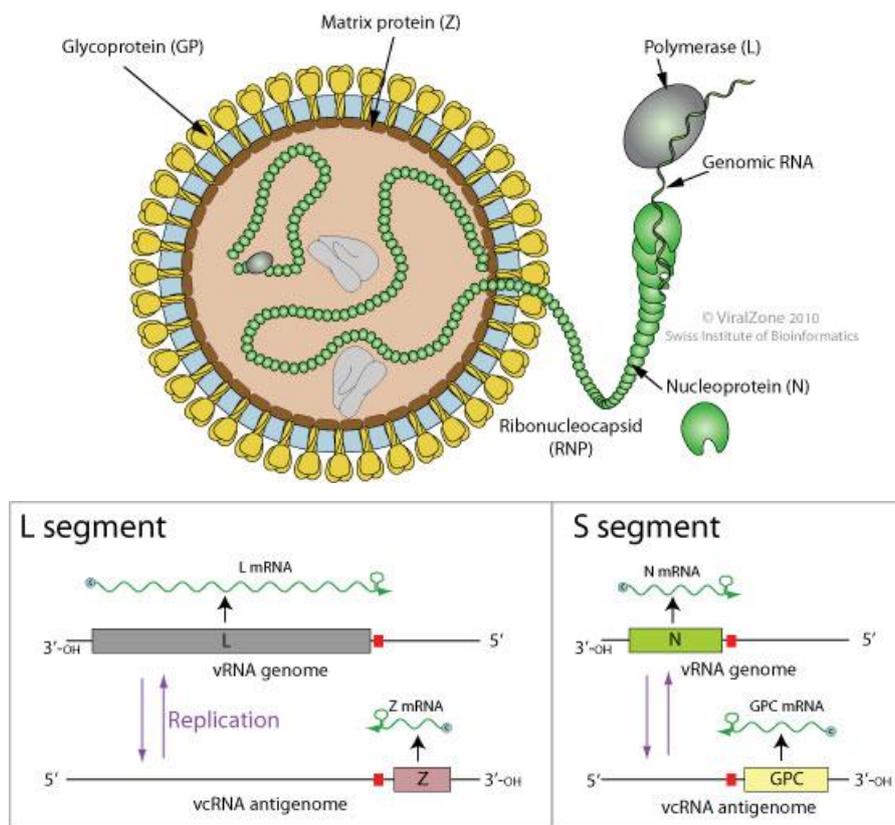


Abb. 1.2: **Struktur und Genom der Arenaviridae** oben: Darstellung der Struktur eines Viruspartikels, unten: Darstellung des Virusgenoms mit den RNS-Segmenten L- und S-Segment in *ambisense* Orientierung (Expasy 2011).

1.2.2 Bunyaviridae

1.2.2.1 Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV)

Die ersten beschriebenen Ausbrüche des CCHFV traten auf der Halbinsel Krim 1944 (Ergonul 2006) und 1956 im Kongo auf und gaben dem Virus seinen Namen (Casals 1969). Heutzutage gilt das CCHFV als weitverbreitet.

Aufgrund der Daten, die bei verschiedenen Ausbrüchen von CCHF gesammelt wurden, konnte das CCHFV in sieben genetisch verschiedene Gruppen eingeteilt werden, von denen drei in Afrika, zwei in Europa und zwei in Asien vorkommen (Burney et al. 1980, Drosten et al. 2002b, Dunster et al. 2002, el-Azazy, Scrimgeour 1997, Nabeth et al. 2004a, Nabeth et al. 2004b, Papa et al. 2002a, Papa et al. 2002b, Papa et al. 2004, Sheikh et al. 2005, Williams et al. 2000).

Das CCHFV wird durch Zecken (besonders durch *Hyalomma marginatum marginatum*), (Watts 1988) übertragen. Die Transmission durch infiziertes Blut und Körperflüssigkeiten bzw. Gewebe von Tieren und Menschen ist ebenfalls bewiesen (Swanepoel et al. 1985, van de Wal et al. 1985, van Eeden et al. 1985).

Nach einer Inkubationszeit von einem Tag bis zu einer Woche folgt eine prä-hämorrhagische Phase mit Fieber, Kopfschmerzen und Erbrechen, die dann ab dem 3.-5. Tag in eine hämorrhagische Verlaufsform übergehen kann. Diese kann durch Multiorganversagen zum Tod führen oder nach spätestens 20 Tagen ausheilen. Die Symptome können individuell stark variieren (Weber, Mirazimi 2008). Insgesamt schwankt die Mortalität zwischen 30-70% (Baskerville et al. 1981, Schwarz et al. 1997, Swanepoel et al. 1989)

1.2.2.2 Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV)

Das RVFV konnte 1931 zum ersten Mal aus moribunden Schafen in Kenia isoliert werden (Daubney et al. 1931). Inzwischen ist das RVFV auf dem gesamten afrikanischen Kontinent südlich der Sahara verbreitet und gelangte im Jahr 2000 über Saudi Arabien und Yemen auf den asiatischen Kontinent. Die jüngsten Ausbrüche wurden aus Madagaskar 2008 (Corso et al. 2008) und aus Südafrika im Juli 2010 (228 Fälle, 26 Tote) (NICD 2010) gemeldet und im April 2011 (27 Fälle, keine Toten) (NICD 2011).

Obwohl RVFV zum Genus der Phleboviren, Familie der Bunyaviridae, gehört, wird es nicht von Sandfliegen (*Phlebotomen*), sondern von verschiedenen Stechmücken (*Culex*- und *Aedes*-arten) übertragen. Außerdem kann es zur Aerosolübertragung und zur Infektion durch kontaminiertes Blut oder Gewebe von Tieren kommen. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bisher nicht bekannt.

Nach einer Inkubationszeit von 2-6 Tagen treten die ersten typischen Symptome auf: Fieber, Myalgien, retro-orbitale Schmerzen, Photophobie und Ikterus. Hämorrhagien oder Enzephalitiden entwickeln sich bei weniger als 1% der Patienten, von denen 50% versterben.

In Experimenten hat sich Ribavirin in Kombination mit Interferon bei RVFV-infizierten Mäusen, Ratten oder Affen als effizient erwiesen (Peters et al. 1986). Bislang ist diese Therapie noch nicht an infizierten Patienten getestet worden.

Es wurde ein effektiver, hoch immunogener und günstiger inaktivierter Impfstoff entwickelt, der sich in Tierversuchen jedoch als teratogen erwies (Davies 2006). Neue Hoffnungen ruhen deshalb auf einem Klon des RVFV, dem Klon 13, der sich nicht nur als hoch immunogen in Schafen und Ziegen erwiesen hat (Muller et al. 1995), sondern bisher auch keine teratogene Wirkung zeigte (Hunter, Bouloy 2001).

1.2.2.3 Genom und Strukturaufbau der Bunyaviridae

Die Bunyaviridae sind eine der größten Virenfamilien und umfassen mehr als 350 Mitglieder weltweit. Sie wurden unterteilt in fünf verschiedene Genera: Phlebovirus, Orthobunyavirus, Hantavirus, Tospovirus und Nairovirus (Fauquet, Fargette 2005), zu denen auch das CCHFV und das RVFV zählen. Die Viren dieser Familie sind behüllte, sphärische (-)ss-RNA-Viren mit einem Durchmesser von ca. 100nm.

Das Genom der CCHFV setzt sich aus drei Segmenten mit Negativ-Strang-Orientierung zusammen, die als S-, M- und L-Segment bezeichnet werden. Wie alle Bunyaviren besitzt auch das CCHFV vier Strukturproteine: die zwei Hüllproteine *Gc* und *Gn*, die auf dem M-Segment kodiert sind, dem Nukleokapsidprotein *N* auf dem S-Segment und einer RNS-abhängigen Polymerase *L*, die auf dem L-Segment kodiert wird. Außerdem wurden auf den S- und M-Segmenten noch Nicht-Strukturproteine (NSs, NSm) gefunden (Altamura et al. 2007, Blakqori et al. 2007, Fuller et al. 1983, Pollitt et al. 2006) (s. Abb. 1.3).

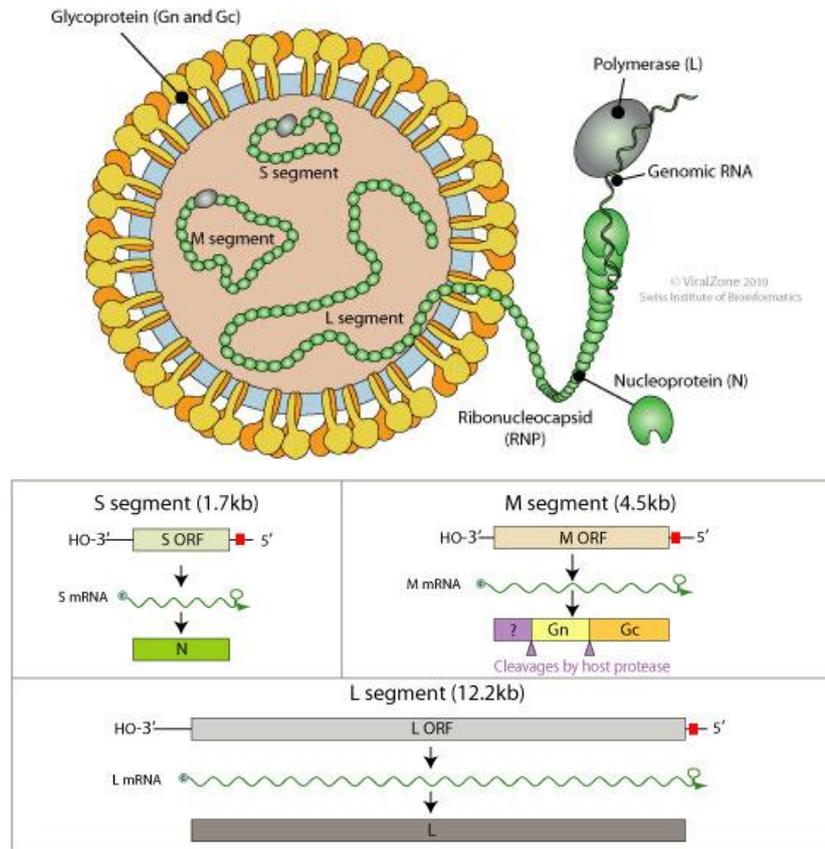


Abb. 1.3: **Struktur der Bunyviridae und Genom der CCHFV** oben: Darstellung der Struktur eines Viruspartikels, unten: Darstellung des CCHF-Virusgenoms mit 3 negativen RNS-Segmenten: S-, M-, L-Segment (Expasy 2011).

Bei dem RVFV zeigen das L- und M-Segment eine negative Polarität. Sie kodieren für die RNA-Polymerase und die Glykoproteine Gn und Gc. Das S-Segment ist *ambisense* organisiert, sodass in 5'-Richtung das Nukleoprotein N und in 3'-Richtung ein Nicht-Strukturprotein NSs kodiert werden (Giorgi et al. 1991) (s. Abb. 1.4).

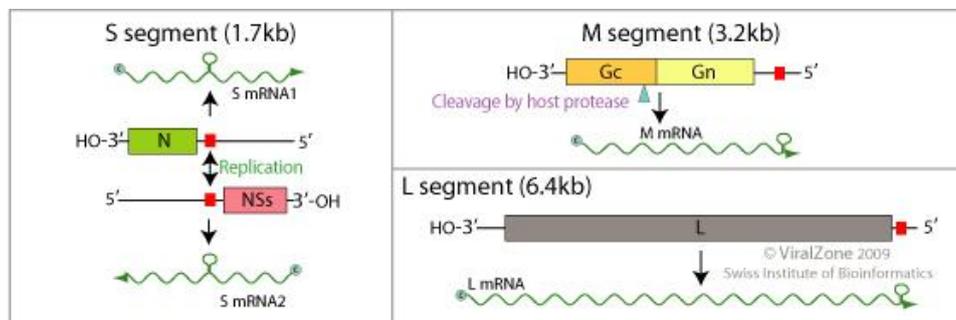


Abb. 1.4: **Genom des RVFV** Darstellung des RVFV-Virusgenoms mit den negativen RNS-Segmenten: M und L und dem S-Segment mit *ambisense* Orientierung (Expasy 2011).

1.2.3 Flaviviridae

1.2.3.1 Gelbfieber-Virus (YFV)

Die ersten historisch gesicherten Fälle von Gelbfieber traten 1648 in Mexiko auf. Ursprünglich wurde das YFV vom afrikanischen Kontinent über den Sklavenhandel nach Amerika importiert. Heute ist YF in Afrika und Südamerika endemisch.

Im Zeitraum zwischen Dezember 2008 bis April 2009 kam es in Brasilien zu dem jüngsten gemeldeten Ausbruch, bei dem 48 Personen an YF erkrankten und davon 20 Menschen (CDC 2010) verstarben.

Erstmals gelang es im Jahr 1900 Walter Reed zu beweisen, dass YF durch die Stechmücke *Aedes aegypti* übertragen wird (Bean 1983). Es sind darüber hinaus weitere Vektoren bekannt: *Aedes africanus* (in Afrika), Stechmücken der Gattungen *Haemagogus* und *Sabethes* (in Südamerika) (Barrett,Higgs 2007). Es sind keine Fälle von Mensch-zu-Mensch-Übertragung oder nosokomialer Übertragung bekannt.

Drei bis sechs Tage nach dem Mückenstich treten Fieber, Übelkeit, Kopf- und Gliederschmerzen als erste Symptome auf. Nach einer kurzzeitigen Besserung kommt es entweder zur Ausheilung oder zur Remission mit einem Wiederanstieg des Fiebers, Hämatemesis, Hypotonie, Bauchschmerzen, Nierenversagen und Leberversagen mit Ikterus. Ungefähr 50% der Patienten, die in die zweite Phase eintreten, versterben an Organversagen und Schock. Insgesamt beträgt die Mortalität der YF-Infektionen 20% (Monath 2001).

YF ist das einzige VHF, für das bisher ein Impfstoff entwickelt werden konnte. Für die erstmalige Entwicklung dieses Lebendimpfstoffes (Stamm 17D) wurde Max Theiler im Jahre 1951 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Bei einer Infektion mit YFV ist bisher keine effektive Therapie bekannt, sodass lediglich unterstützende Maßnahmen wie Elektrolyt- und Flüssigkeitsersatz oder Bluttransfusionen unternommen werden können.

1.2.3.2 Dengue-Virus (DENV)

Das Dengue-Virus (DENV) ist 1944 von Albert Sabin und J. Schlesinger als Krankheitserreger des Dengue-Fiebers (DF) identifiziert worden. Historische Berichte über das DF datieren mehr als 200 Jahre zurück, 1779 in Jakarta, Indonesien und Kairo,

Ägypten. Die erste im englischsprachigen Raum berichtete Epidemie fand 1780 in Philadelphia, USA, statt, weitere 1934 in Florida und 1945 in New Orleans (Tsai TF et al. 2005). Große Epidemien mit hämorrhagischem Schock (Dengue fever virus haemorrhagic shock syndrome – DHSS) liefen in Australien 1897, in Griechenland 1928 und in Formosa 1921 ab.

Inzwischen ist DENV in über 100 Ländern in Asien und Afrika, am Pazifik und in der Karibik (Freedman et al. 2006) endemisch und laut *World Health Organization (WHO)* kommt es jährlich zu 50-100 Millionen Infektionen, von denen 500.000 Patienten ein hämorrhagisches Dengue-Fieber (DHF) entwickeln, von denen 2,5% versterben (WHO 2009b). Dengue gehört zur Familie der Flaviviridae und wird antigenetisch in vier Serotypen unterteilt: DENV 1-4 (Halstead 1988, Webster et al. 2009), die durch die Stechmücke *Aedes aegypti* oder *Aedes albopictus* übertragen werden (Halstead 2007). In einigen Regionen kommen noch weitere Mückenarten in Frage: *Aedes polynesiensis* (Polynesien), *Aedes scutellaris* (Südpazifik) (Mackerras 1946, Rosen et al. 1954). Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bisher nicht bekannt geworden.

Das DENV kann zwei Ausprägungen einer Erkrankung verursachen: Dengue-Fieber (DF) oder das hämorrhagische Dengue-Fieber (DHF), das in seiner schwersten Form in das Dengue-Schock-Syndrom (DSS) übergehen kann.

Die klinischen Symptome des DF, das hauptsächlich bei älteren Kindern und Erwachsenen beobachtet wird, beginnen mit einem abrupten Fieberanstieg nach einer 4-7 tägigen Inkubationszeit. Häufig wird das Fieber von Kopfschmerzen und starken retro-orbitalen Schmerzen begleitet (Endy et al. 2002, Kabra et al. 1999). Die schweren Muskel- und Gliederschmerzen, die bei einigen Patienten auftreten, erklären den historischen Namen „break bone fever“ („Knochenbrecherfieber“) (McBride 1999). Bei schwerem Verlauf lassen sich Hautausschläge und Petechien erkennen. Haut- und Schleimhautblutungen können sowohl bei schweren als auch bei milden Verläufen beobachtet werden (Tsai CJ et al. 1991).

Das DHF, das meist Kinder unter 15 Jahren befällt, beginnt wie das DF, verschlechtert sich dann aber nach wenigen Tagen dramatisch. Es wird charakterisiert durch

Hämorrhagien, Thrombozytopenie und Organschädigung, evtl. Krampfanfälle und allgemeine Zeichen eines Schocks (DSS).

Es wird vermutet, dass es bei einer Zweitinfektion durch eine sogenannte infektionsverstärkende Antikörperbildung (engl: *antibody-dependent enhancement of infection*) zu den schweren Verläufen kommt (Pierson, Diamond 2008). Nachdem das DF ausgeheilt ist, bleibt nur eine Immunität gegen den Serotypen, der diese Infektion verursacht hat. Sie bietet keinen Schutz vor einer Infektion mit anderen DENV-Serotypen. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass die Serotypen aus verschiedenen Genotypen bestehen, die mit unterschiedlichen Virulenzen assoziiert sind (Leitmeyer et al. 1999, Sanchez, Ruiz 1996).

1.2.3.3 Genom und Strukturaufbau der Flaviviridae

Die Familie der Flaviviridae setzt sich zusammen aus den Genera: Hepacivirus, Pestivirus und Flavivirus, zu denen auch das DENV und YFV gehören.

Flaviviren besitzen einen Durchmesser von 40 bis 50nm. Das sphärische Kapsid ist von einer Hüllmembran umgeben. Die einzelsträngige RNS liegt in Plusstrangorientierung vor und weist am 5'-Ende eine Cap-Struktur auf. Die Strukturproteine C, PrM und E bilden die Hüllmembran und zwei Oberflächenantigene. Die Nicht-Strukturproteine NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5 kodieren für die RNS-Polymerase und eine Protease-Funktion für das virale Polyprotein (Chambers et al. 1990) (s. Abb. 1.5).

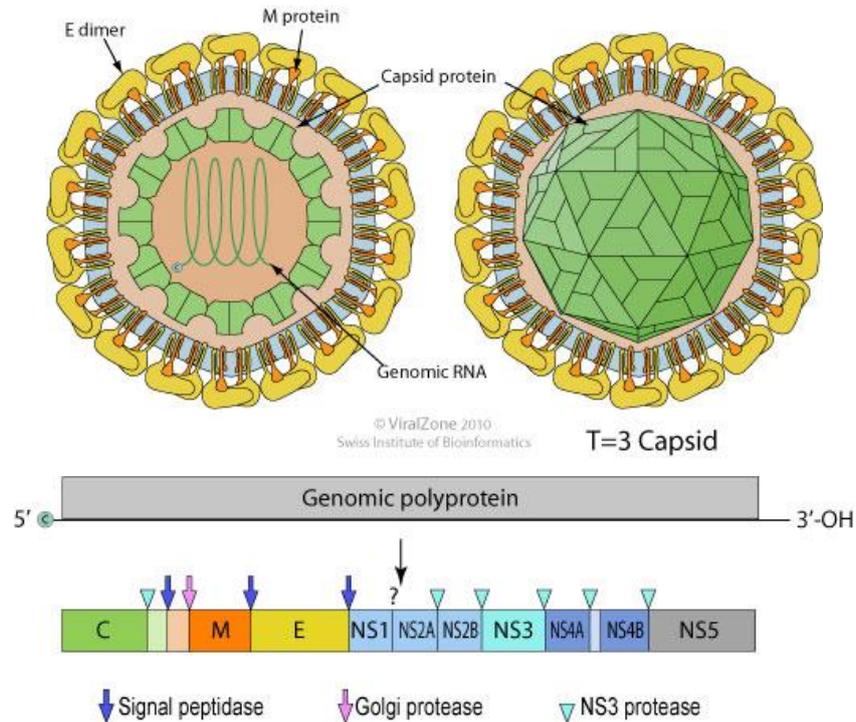


Abb. 1.5: **Struktur und Genom der Flaviviridae** oben: Darstellung der Struktur eines Viruspartikels, Durchmesser: 50 nm, unten: Darstellung des Virusgenoms mit einem linearen, einsträngigen RNS-Segment, das ein Polyprotein kodiert (Expasy 2011).

1.2.4 Filoviridae

1.2.4.1 Ebola-Virus (EBOV)

Das EBOV wurde 1976 bei Epidemien in Yambuku, in der Demokratischen Republik Kongo, (318 Fälle, 280 Tote) und im Sudan (284 Fälle, 151 Tote) entdeckt (Bardi 2002). Weltweite Aufmerksamkeit bekam das Virus erst 1995 bei einem Ausbruch in Kikwit in der Demokratischen Republik Kongo (315 Fälle, 244 Tote). Auch die letzten großen Ausbrüche des EBOV wurden in der Demokratischen Republik Kongo im Dezember 2008 bis Februar 2009 (32 Fälle, 15 Tote) und im Dezember 2007 bis Januar 2008 (149 Fälle, 37 Tote) gemeldet (CDC 2011). Bisher ist das EBOV in Afrika und das verwandte Restonvirus (EBOVRE) in Südostasien beobachtet worden.

Das EBOV gehört, genauso wie das MARV, zu der Familie der Filoviridae und lässt sich in vier Spezies unterteilen: (1) Sudan Ebolavirus (EBOVS), (2) Zaire Ebolavirus (EBOVZ), (3) Cote d'Ivoire Ebolavirus (EBOVIC), (4) Reston Ebolavirus (EBOVRE). Eine fünfte Spezies wurde bei einem Ausbruch in Uganda 2007 beschrieben: Bundibugiyu Ebolavirus (BDBV) (Towner et al. 2008, Wamala et al. 2010). Außerdem ist 2011 von Negrodo et al. ein

Ebola-verwandtes Filovirus, das Lloviu-Virus (LLOV) in Langflügelfledermäusen (*Miniopterus schreibsii*) aus Asturien detektiert worden (Negredo et al. 2011).

Das natürliche Reservoir und Vektoren der EBOV sind unbekannt, doch es sind Viren in Fruchtfledermäusen (*Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti*, *Myonycteris torquata*) in Afrika nachgewiesen worden (Leroy et al. 2005, Swanepoel et al. 1996).

Beobachtete Fälle, bei denen eine Infektion auf den Menschen stattgefunden hat, sind meist durch Kontakt mit Blut infizierter Tiere zu erklären (Leroy et al. 2009). Aerogene Transmission, Schmierinfektion oder neonatale Transmission sind ebenfalls möglich.

Die Inkubationszeit wird mit 2-21 Tagen angegeben (Seiler 2008). Zu den ersten Symptomen gehören hohes Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen und abdominale Beschwerden. Bereits früh treten Blutungen in den Konjunktiven oder Schleimhäuten auf. Hämorrhagien im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge sind häufig. Die Mortalitätsrate beträgt zwischen 50-90%. Der Tod tritt nach fünf bis neun Tagen durch schwere Blutungen oder Schock ein (Formenty et al. 1999, Richards et al. 2000, WHO 1978).

Ein Impfstoff für EBOV ist bisher noch nicht produziert worden. Es laufen jedoch Versuche für eine Vakzine, die auf einem rekombinanten vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) basiert, das ein Glykoprotein (GP) von Filoviren exprimiert (Geisbert et al. 2009). Davon abgesehen sind erste Therapieansätze für EBOZ veröffentlicht worden. Mit Hilfe von siRNS-Molekülen (eng: "small interfering RNA" = kurze interferierende RNS) konnte die Virusvermehrung bei mit EBOV infizierten Meerschweinchen aufgehalten werden (Geisbert et al. 2010). In der Praxis beschränkt sich die Therapie bei einer EBOV-Infektion beim Menschen auf unterstützende Maßnahmen.

1.2.4.2 Marburg-Virus (MARV)

Werner Slenczka, Rudolf Siebert und Dietrich Peters gelang es 1967 in Marburg erstmals, das MARV aus Personen zu isolieren, die sich beim Umgang mit Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) aus Uganda infiziert hatten. Darauf folgend wurde das MARV bei Personen in Angola, Demokratische Republik Kongo, Kenia und Südafrika nachgewiesen.

Genau wie das EBOV gehört das MARV zur Familie der Filoviridae. Auch für MARV gelten Fledermäuse als Vektoren, seitdem MARV-Sequenzen in Fruchtfledermäusen (*Rosettus aegypticus*) und insektenfressenden Fledermäusen (*Rhinolophus eloquens*, *Miniopterus inflatus*) nachgewiesen worden (Swanepoel et al. 2007, Towner et al. 2009).

Bei engem Kontakt zu infizierten Personen kann es zu einer Mensch-zu-Mensch-Übertragung durch Kontakt mit kontaminierten Körperflüssigkeiten, neonatale Transmission oder durch Tröpfcheninfektion kommen.

3-14 Tage nach der Infektion treten hohes Fieber, Kopfschmerzen und Myalgien ein. Makulopapulöse Ausschläge sind, wie bei EBOV, an den Schleimhäuten frühe Symptome. Häufige Komplikationen sind Hämorrhagien. Die Mortalität beim MARV ist mit 30% jedoch etwas niedriger als bei EBOV (Gear et al. 1975, Slenczka 1999, Smith et al. 1982).

Bisher ist kein Impfstoff gegen eine Infektion mit MARV vorhanden. Doch es ist eine Vakzine entwickelt worden, die in den Tierversuchen bereits einen effektiven Schutz gegen EBOVZ, EBOVS, EBOVCI und MARV aufwies. (s. Kap. 1.2.4.1, S.13) In der Praxis beschränkt sich die Therapie bei einer MARV-Infektion, wie bei EBOV (s. Kap. 1.2.4.1, S.13), bis jetzt auf unterstützende Maßnahmen.

1.2.4.3 Genom und Strukturaufbau der Filoviridae

Zu den Filoviridae gehören Marburg- und Ebolaviren. Die Virionen der Filoviren haben eine pleomorphe, fadenförmige Gestalt (lat: „filum“= Faden). Während die Länge variabel sein kann (MARV: 665nm, EBOV: 804nm), haben die Partikel einen konstanten Durchmesser von 80nm. Die Filamente bestehen aus einem helikalen Nukleokapsid, das von einer Membranhülle umgeben ist.

Die einzelsträngige, nichtsegmentierte RNA liegt in Negativstrangorientierung vor (EBOV: 18957bp, MARV: 19099bp) (Modrow et al. 2003). An den 3'- und 5'-Enden befinden sich nichtkodierende Sequenzen und dazwischen das Nukleoprotein (NP), die viralen Proteine (VP40, VP35, VP30) und die RNA-Polymerase, die das Nukleokapsid bilden. Außerdem gibt es Glykoproteine (GP) zur Fusion der viralen Membran mit der Membran der Wirtszelle und ein weiteres Polypeptid, VP24, das mit der Membran assoziiert ist (s. Abb. 1.6).

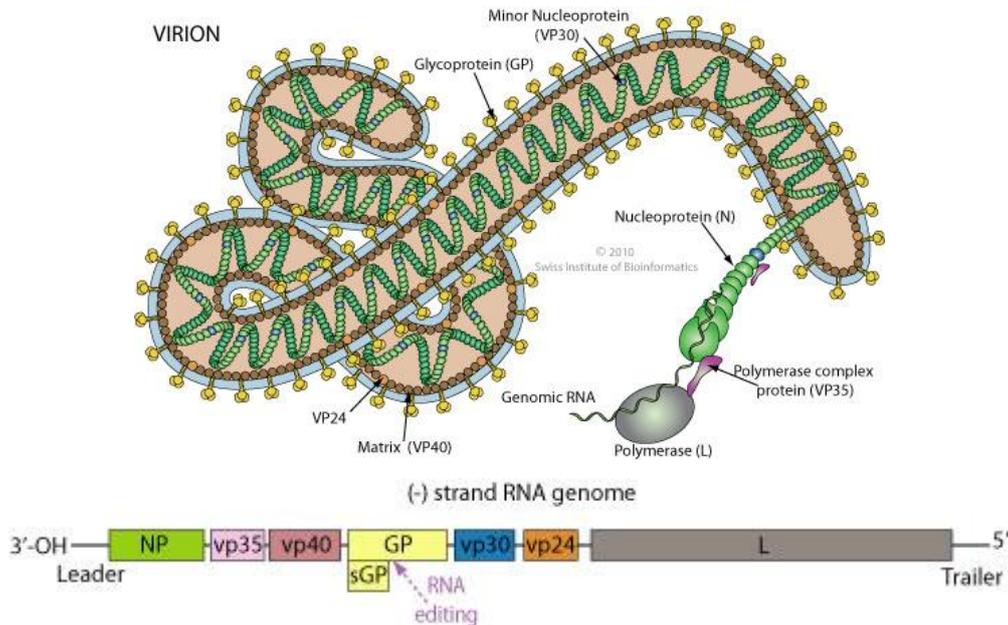


Abb. 1.6: **Struktur und Genom der Filoviridae** oben: Darstellung der Struktur eines fadenförmigen Viruspartikels, unten: Darstellung des Virusgenoms mit einem linearen, einsträngigen RNS-Segment, das ein Polyprotein kodiert (Expaty 2011).

1.3 Bestehende Diagnostikverfahren für hämorrhagische Fiebertypen

Um eine Virusinfektion nachzuweisen, gibt es verschiedene Methoden, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion angewendet werden können. Zum besseren Verständnis ist in Abb. 1.7 das sogenannte „Diagnostische Fenster“ dargestellt. Nach einer Virusinfektion kommt es zuerst zu einer Vermehrung der Viren und damit zu einem erhöhten Titer im Blut (Virämie). In dieser Phase kann das Virusgenom direkt detektiert werden. Verfahren, die hierfür verwendet werden, sind die PCR-Technik oder ein gegen virale Antigene gerichteter ELISA. Die Probenentnahme gestaltet sich recht schwierig, da diese virämische Phase nur von kurzer Dauer ist und die Symptome einer Infektion meist erst später auftreten.

Durch die Immunantwort werden im Verlauf der Erkrankung Antikörper gebildet. Erst kommt es zu einem Anstieg der IgM- und später zu einem Anstieg der IgG-Antikörper. Mittels EIA (engl: *enzyme immuno assay*, deut: Enzymimmunoassay) basierender Technologien inklusive des ELISA und des sog. IFT (Immunfluoreszenztest) können diese Antikörper im Serum detektiert werden und Rückschlüsse auf eine stattgefundene Infektion geben.

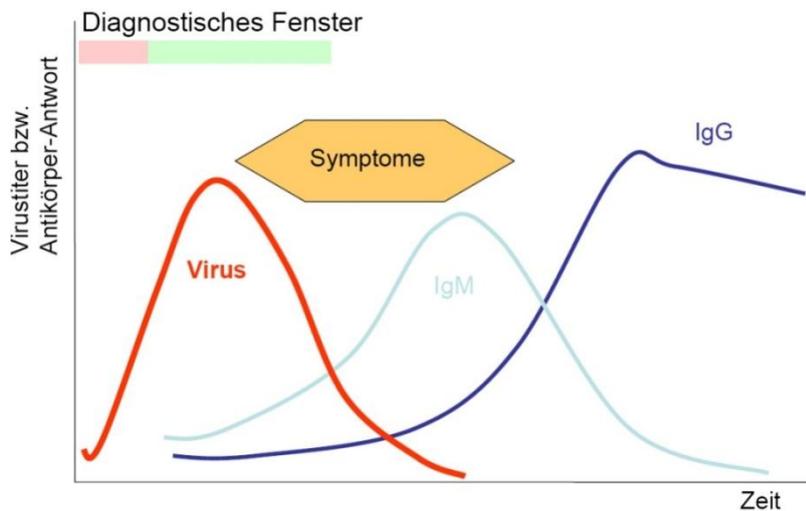


Abb. 1.7: **Diagnostisches Fenster.** Darstellung des Virustiters bzw. der Antikörper-Antwort nach Infektion mit einem Erreger (Molekulare Virologie Heidelberg 2010).

Die Diagnose von HFV basiert auf der Kombination von Virusisolation (Digoutte et al. 1992), molekularen (z.B. RT-PCT)(Drosten et al. 2002a, Palacios et al. 2006, Sudiro et al. 2001) und serologischen Nachweisverfahren (z.B. ELISA) (Saluzzo, Le Guenno 1987). In der akuten klinischen Phase sind die Antigendetektion und die qRT-PCR die geeignetsten Verfahren. Jedoch geht die VHF-Diagnostik mit bestimmten Herausforderungen einher: (1) Aufgrund eher unspezifischer Symptome müssen die Proben bei Verdacht auf VHF auf mehrere HFV getestet werden. (2) Um das gesamte diagnostische Fenster abzudecken, müssen molekulare und serologische Methoden miteinander kombiniert werden. (3) Bei einem Ausbruch eines HFV kann es zu einer schnellen Verbreitung der Infektion kommen, sodass eine große Anzahl an Proben gleichzeitig getestet werden muss.

Ein ideales Verfahren zur Detektion von HFV sollte deshalb möglichst (i) zeitsparend sein (Burger et al.), (ii) eine hohe Spezifität, (iii) eine hohe Sensitivität (Sudiro et al. 2001), (iv) eine gute Reproduzierbarkeit (Sudiro et al. 2001) und (v) einen hohen Probendurchlauf mit (vi) simultaner Detektion eines ganzen Spektrums verschiedener Viren aufweisen.

Der CBA ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis von multiplen Analyten und hat sich als sensibles, präzises und effizientes Mittel zur Virusdiagnostik erwiesen (Bellisario et al. 2001). In der VHF-Diagnostik ist bisher jedoch nur ein CBA für den Antikörpernachweis für DENV entwickelt worden (Shu, Huang 2004). Ein CBA, das im Multiplex-System

mehrere HFV gleichzeitig auf molekularer und serologischer Ebene detektiert, wäre deshalb wünschenswert.

1.4 Cytometric Bead Array (CBA)

1.4.1 Aufbau und Prinzip des Durchflusszytometers

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, mit dem verschiedene physikalische Eigenschaften einzelner Partikel (z.B. Zellen oder Beads (deut.: Mikrokugeln) in einem Flüssigkeitsstrom gleichzeitig gemessen und analysiert werden können. Entwickelt wurde die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie 1968 von Wolfgang Göhde (Goehde, Dittrich 1971) an der Wilhelms-Universität Münster und ist seitdem ein Standardmessverfahren in der Immunologie, Onkologie und allgemeinen Forschung.

Die Technologie beruht auf der Messung von optischen Signalen, welche die Partikel, beim Passieren eines Laserstrahls emittieren. In einer laminaren Strömung werden die zu untersuchenden Partikel hintereinander aufgereiht und mit verschiedenen Laserstrahlen unterschiedlicher Emissionsmaxima, z.B. 585nm oder 660nm, angestrahlt (s. Abb. 1.9). Wenn ein Partikel das einfallende Laserlicht ablenkt, kommt es zu Lichtstreuung (Tyndall-Effekt). Dabei hängt das Maß der Streuung von der Größe und der internen Komplexität ab. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist proportional zur Zell- oder Partikeloberfläche, während das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) proportional zur internen Komplexität bzw. Zellgranularität ist. Die gleichzeitige Messung und deren korrelierte Darstellung am Computer erlauben eine Differenzierung von Zelltypen in einem heterogenen Gemisch.

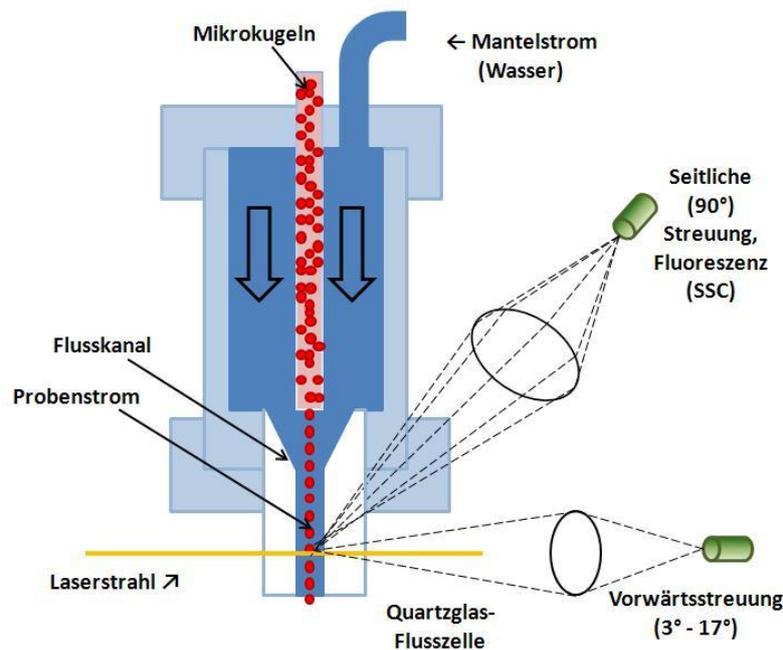


Abb. 1.8: **Prinzip der Durchflusszytometrie**

Durch Markierung bestimmter Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen kann die Identifizierung eines bestimmten Zelltyps erfolgen. Dabei sollten für die gleichzeitige Messung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe beachtet werden, dass die Farbstoffe zwar gleiche Absorptionsspektren besitzen dürfen, sich jedoch in ihren Emissionsspektren unterscheiden sollten.

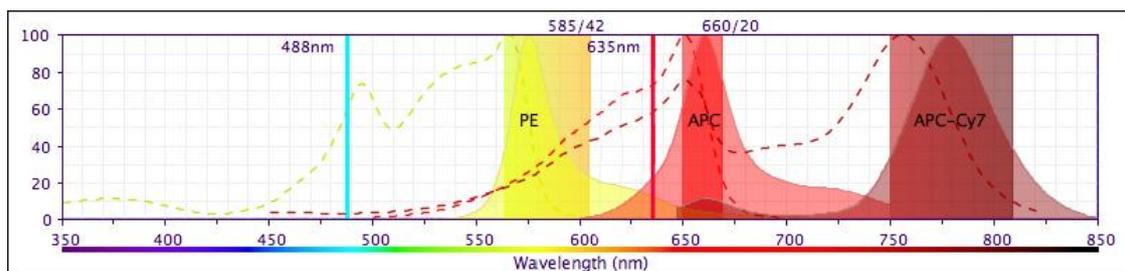


Abb. 1.9: **Darstellung der Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.** Dargestellt sind die Absorptionsmaxima von PE (480 nm), APC (650 nm), APC-Cy7 (650 nm) als gestrichelte Linien, die Emissionsmaxima von PE (585nm), APC (660 nm), APC-Cy7 (775 nm) als schraffierte Bereiche. Zusätzlich sind die anregenden Laserstrahlen der Wellenlängen von 488 nm und 635 nm angegeben. (BD 2011)

1.4.2 Der Cytometric Bead Array

Der *Cytometric Bead Array* (CBA) nutzt fluoreszierende Beads (Mikrokugeln) in der Durchflusszytometrie zur simultanen Analyse in einer einzigen Probe. Es konnte gezeigt

werden, dass der CBA sogar eine höhere Sensitivität, bessere Reproduzierbarkeit, kürzere Vorbereitungszeit und höhere Datendurchsatzleistung aufweist als bisher verwendete Diagnostikverfahren (Carson, Vignali 1999, Dasso et al. 2002). Ein weiterer Vorteil des CBAs, den man sich besonders in der Diagnose zunutze macht, ist eine gleichzeitige Detektion verschiedener Parameter: Antikörper (IgM, IgG), lösliche Zytokine, virale Antigene und virales Genom.

Der CBA, der in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde, dient dem direkten Nachweis der viralen Genome hämorrhagischer Fieberviren. Die verwendeten Beads (*BioPlex-COOH-Beads*, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) besitzen einen Durchmesser von $5,6\mu\text{m}$ und sind mit verschiedenen Verhältnissen zweier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe gefüllt (xMap-Technologie), z.B. mit APC und APC-Cy7. Diese Farbstoffe können aufgrund ihrer unterschiedlichen Emissionsspektren (s. Abb.1.11) unterschieden werden. Durch unterschiedliche Verhältnisse dieser beiden Farbstoffe zueinander ist es theoretisch möglich, bis zu 100 Beadpopulationen gleichzeitig zu differenzieren und simultan zu verwenden. In der Praxis scheint die Obergrenze aber eher bei 30 verschiedenen Beadpopulation zu liegen.

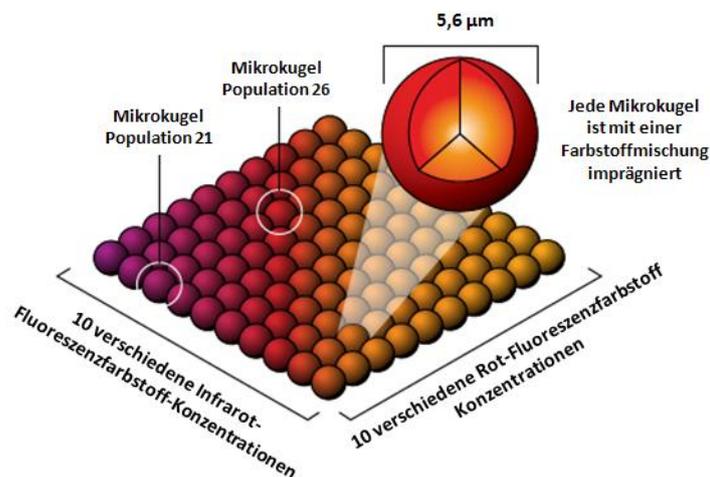


Abb.1.10: **Fluoreszenzfarbstoffspektrum der Beads** Durch unterschiedliche Mischungen des roten und infraroten Fluoreszenzfarbstoffes können bis zu 100 Beadpopulationen unterschieden werden. Luminex Technology Overview (Panomics 2011)

Auf ihrer Oberfläche sind die Beads mit Carboxylgruppen beschichtet, die es ermöglichen aminierte Oligonukleotidsonden durch Peptidbindungen kovalent an die Beads zu koppeln. Wenn in einer vorgeschalteten PCR biotinylierte Primer verwendet werden, können diese PCR-Produkte nach Hybridisierung an die beadgekoppelten Sonden mit Hilfe von Phycoerythrin (PE, Fluoreszenzfarbstoff Emissionsmaximum: 585nm), nachgewiesen werden (Armstrong et al. 2000, Deregt et al. 2006, Hindson et al. 2008, Jiang et al. 2006, Oh et al. 2007, Schmitt et al. 2006).

Um die notwendige Sensitivität zu erreichen, die der Sensitivität einer Real-Time-PCR entspricht, ist der Präamplifikationsschritt notwendig. Hierin ähnelt die CBA-Technik der Mikroarray-Technik. Sie besitzt jedoch eine bessere Hybridisierungskinetik, da die Hybridisierung in einer Flüssigphase und nicht an einer festen Oberfläche stattfindet.

Multiplex-PCRs mit der Hybridisierung der Amplifikate an spezifische Bead-Sonden sind bereits mehrfach erfolgreich getestet worden (Deregt et al. 2006, Horejsh et al. 2005, Lee et al. 2007).

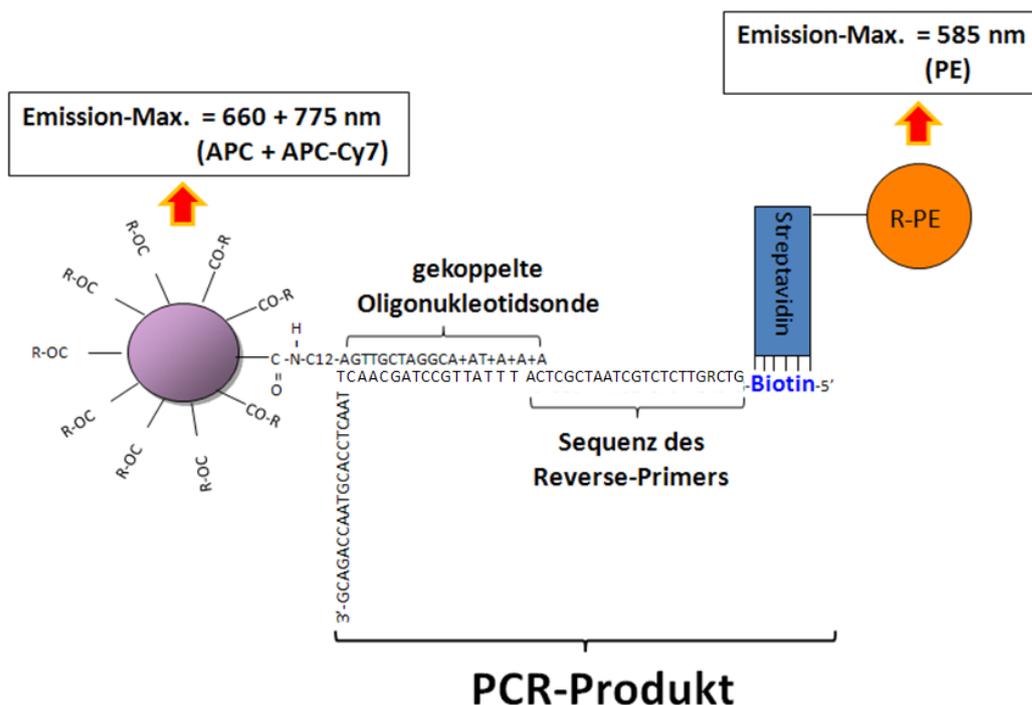


Abb.1.11: **Cytometric Bead Array (CBA)** Darstellung des Aufbaus eines CBAs: an das carboxylierte Bead ist mit einer Peptidbindung eine Oligonukleotidsonde gekoppelt, die an biotinylierte DNS hybridisiert, im Zytometer nachweisbar durch die Fluoreszenzfarbstoffe: APC (Emissionsmaximum: 660nm), APC-Cy7 (Emissionsmaximum: 775nm) und Strept.-PE (Emissionsmaximum: 585nm)

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *Cytometric Bead Array* zum Nachweis der Virusgenome der acht afrikanischen HFV: LASV, CCHFV, RVFV, EBOVZ, EBOVS, MARV, DENV, YFV.

Um den CBA entwickeln zu können, sollten Multiplex-PCR Mischungen erstellt und optimiert werden.

- Für die simultane Amplifikation der verschiedenen afrikanischen HFV musste zuerst eine Multiplex-RT-PCR aufgebaut und mit Hilfe synthetischer RNS-Standards optimiert werden. Bei der Erstellung der Primermischungen musste besonders auf die Bildung von Primerdimeren geachtet werden, welche die Sensitivität des Testsystems beeinträchtigen konnten. Diese Optimierung sollte durch eine SYBR-Green-qRT-PCR getestet werden. Um die bestmögliche Sensitivität zu erzielen sollten symmetrische und asymmetrische Amplifikationen verglichen werden und die optimale Primerkonzentration bestimmt werden.
- Anschließend sollten aminierte DNS-Sonden an die caboxylierten Beads gekoppelt werden. Diese Kopplung musste mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotidsonden am Durchflusszytometer überprüft werden.
- Mithilfe der Sonden sollten die biotinylierten Produkte der Multiplex-RT-PCR an die Beads hybridisiert werden
- Zum Schluss musste die Detektion der erfolgreichen Hybridisierung mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS-Canto™ II) durchgeführt werden und die analytische Sensitivität und Spezifität des Verfahrens bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Tab.2.1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle/ Hersteller
96 K Microplatte U-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falkonröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Handschuhe – Latex	Mikroflex Corporation, Wien, Österreich
Handschuhe – Nitril	GE Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien
Labortücher (20,5cm×20cm)	Kimberly-Clark Europe Limited, Kings Hill, UK
Mikroschraubgefäße (2,0ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
PCR- Reaktionsgefäße (0,2ml)	Biozym, Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipetten mit Spitzen (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1- 10µl, 1,0-100µl, 101-1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter (0,1-10µl, 1,0-100µl, 101- 1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Protein-Lo-bind Tubes (0,5ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vernichtungsbeutel (300mm×200mm)	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, Deutschland

2.1.2 Geräte

Tab.2.2: Verwendete Geräte

Geräte	Bezugsquelle/ Hersteller
Chemidoc TM XRS System	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
FACS Canto TM II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gefriertruhe (-140°C)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Kühlschrank (5°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
LightCycler [®] 2.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Mikrowelle	AFK Elektro Vertriebs GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Nano Drop [®] ND-1000	Thermo Scientific, Rockford, USA
Spektralphotometer	
Rotator	Snijders, Tilburg, Niederlande
Sterilbank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
SpeedCycler	Analytic Jena, Jena, Deutschland
ThermoCycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortex	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage	Satorius, Stedim biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Wippe	Schuett24 GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.1.3 Chemikalien

Tab.2.3: Verwendete Chemikalien

Substanzen	Bezugsquelle/ Hersteller
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Difco™ Skim Milk	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
DNS- Längenstandard (ultra-low-range, 100kbp)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Ethanol	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid- Lsg.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid (EDAC)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Orange Loading Dye (6x)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
peqGOLD TriFast™FL	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween®20	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer

Tab.2.4: Verwendete Lösungen, Medien und Puffer

Name	Zusammensetzung
Agarosegel [2%ig]	100ml TAE [1x], 2g Agarose, 5µl Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration 0,5ml/ml)
Ethidiumbromid-Lösung	10mg/ml in H ₂ O
(N-morpholino)ethanesulfon-Säure (Holmes et al.)	0,1 M, pH 4,5
FACS-Flow-Trägerflüssigkeit	NaCl, Di-Natrium-EDTA, Kaliumphosphat, Natriumphosphat, Konservierungsmittel

Probenpuffer [2X] (SDS-PAGE)	2,5ml Tris pH6,8 [0,5M], 2ml SDS [10%], 1ml β – Mercaptoethanol, 2,3ml Glycerin [87%], 2,2ml H ₂ O, 10mg Bromphenolblau
TAE [1x]	40ml TAE [50x] ad 1960ml H ₂ O
TAE [50x]	242g Tris: 57,1ml Essigsäure, 100ml EDTA pH8,0 [0,5M]
TGS [10X]	30,22g Tris, 144,13g Glycin, 1g NaN ₃ , ad 1l H ₂ O

2.1.5 Reagenzienansätze

Tab.2.5: Verwendete Reagenziensätze

Name	Bezugsquelle/ Hersteller
Bio-Plex COOH Beads	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Multiplex-RT-PCR-Kit (NoRox-Master)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
LightCycler® RNA Master SYBR Green I-Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Agilent RNA 6000 Nano Reagents Part I	Agilent, Santa Clara, USA
MinElute PCR-Purification-Kit (50)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SP6/T7 Transcription-Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Turbo-DNA-Free- Kit	Ambion, Austin, USA

2.1.6 Ausgangs-RNS

Als Matrize für das RT-PCR-Protokoll (s. Kap. 2.2.1.3.3, S.35) wurde ein rekombinanter RNS-Standard mittels *in-vitro*-Transkription erzeugt. Der hierbei genutzte Vektor, das pCRII-Plasmid, besitzt einen Promotor für die T7-RNS-Polymerase und einen Promotor für die SP6-RNS-Polymerase. Nach Überprüfung der Orientierung der cDNS, die durch TA-Klonierung in den pCRII-Vektor integriert wurde, konnte mittels des SP6/T7 TranskriptionTM-Kit von Roche eine RNS transkribiert werden. Diese wurde nach DNase-Verdau mit dem Turbo-DNA-FreeTM-Kit von Ambion quantifiziert und für eine

Standardreihe in den Verdünnungsstufen 10^7 bis 10^1 Moleküle/ μ l unter Zugabe von tRNS als Carrier aliquotiert.

Für diese Arbeit sind lediglich die RNS-Standards von EBOVS (EBOSNORF UP und EBOSNORF DP) und die RNS-Standards für DENV (DEN-FP und DEN-RP) mittels *in-vitro*-Transkription neu hergestellt worden. (Für eine ausführliche Beschreibung der *in-vitro*-Transkription s. Weidmann et al. von 2003)

Einige der benötigten pCRII-Plasmide für diese Arbeit sind bereits in früheren Projekten der AG Weidmann im Virologischen Institut der Universität Göttingen entwickelt worden. So stammten die RNS-Standard der Filoviren EBOVZ, MARV aus einer Veröffentlichung von Weidmann et al. von 2004, die RNS-Standards des YFV von 2010 (Weidmann et al. 2010) und die RNS-Standards des Phlebovirus RVFV von 2008 (Weidmann et al. 2008). Das CCHFV S-Segment wurde von der AG Weidmann im Rahmen des Projektes „InSan I 0301-V-4303 März 2001 – Juni 2004, Quantitativer Schnellnachweis von Bunyaviridae mittels TaqMan™-PCR-Technologie“ hergestellt.

Für das LASV wurde virale RNS aus Proben vom Bernhard-Nocht-Institut nach der “Acid Guanidinium-Thiocyanate-Phenol-Chloroform-Extraktion”-Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski, Sacchi 1987) gewonnen und als Matrize für die PCR-Amplifikation verwendet (s. Kap.2.2.1.1, S.31).

Tab. 2.6: Verwendete Standard-Primer

HFV	Name der Standard-Primer	Sequenz der Standard-Primer
RVF	RVFSFUP	5'-ACACAAAGACCCCCTAGTGC-3'
	RVFSFDP	5'-ACACAAAGCTCCCTAGAGATACAAA-3'
CCHFV	CCHSF UP	5'-TCTCAAAGAAACACGTGCCG-3'
	CCHSF DP	5'-TCTCAAAGATATCGTTGCCGC-3'
MARV	MARORF UP	5'-ATGGATTACACAGTTTGTGGAGT-3'
	MARORF DP	5'-CTACAAGTTCATCGCAACATGTCT-3'
EBOVZ	EBOORF UP	5'-ATGGATTCTCGTCCTCAGAAAAT-3'
	EBOORF DP	5'-TCACTGATGATGTTGCAGGATT-3'
EBOVS	EBOSNORF UP	5'-ATGGATAAACGGGTGAGAGGT-3'

	EBOSNORF DP	5'-TCAGTCATGTTGAAGAACAGCA-3'
YFV	YFV STD UP	5'-AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGG-3'
	YFV STD DP	5'-AGCCACTGTGAGTTTCAGCA-3'
DENV	DEN FP	5'-AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC-3'
	DEN RP	5'-GCGYTCTGTGCCTGGAWTGAT-3'

2.1.7 Oligonukleotide

Tab. 2.7: Verwendete Primer

Name der Primer	Sequenz der Primer	Länge der Zielregion in bp	Zielstruktur
RVF-FP	5'-TGCCACGAGTYAGAGCCA-3'	128	S-Segment
RVF-RPptr-Biotin	5'-Biotin-GTGGGTCCGAGAGTYTGC-3'		(Weidmann et al. 2008)
CCSMW-FP	5'-GGYACYAAGAAAATGAAGAAGG-3'	172	S-Segment
CCSMW-RP-Biotin	5'- Biotin-CRGGGAKTGTGCCRAAGCA-3'		
MBR-FP2	5'-ACTGARATYACACACAGTCAGACA-3	88	Nukleoprotein
MBR-RP2- Biotin	5'- Biotin-TRTTGTTTTCAATTTCTGCAGC-3'		(Weidmann et al. 2004)
EBOZ-FP2	5'-TGATCCYGATGATGGAAGCTAC-3'	91	Nukleoprotein
EBOZ-RP2- Biotin	5'-Biotin- GTCTAGATCGAATAGGACCAAGTCATCT-3'		(Weidmann et al. 2004)
EBOS(ENS)-FP	5'-TTGACCCGTATGATGATGAGAGTA-3'	89	Nukleoprotein
EBOS(ENS)-RP-Biotin	5'-Biotin-CAAATTGAAGAGATCAAGATCTCCT-3'		
YFV-FP	5'-ATTGAGGTGCATTGGTCTGC-3'	94	5' UTR
YFP-RP- Biotin	5'-Biotin-GTCRRTTCTCTGCTAATCGCTCA-3'		(Weidmann et al. 2010)
DEN-FP	5'-AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC-3'	87	3' UTR
DEN-RP2- Biotin	5'-Biotin-CTGHRGAGACAGCAGGATCTCTG-3'		
LAS-LNA-FP1	5'-GGTGCTGTGAACCTAG+AT-3'	127	Josiah(JOS),
LAS-LNA-RP1-Biotin	5'-Biotin-GGAATGCAGATTTGT+T+GA-3'		L-Segment

LAS-LNA-FP2	5'-AACCGATCATTTACT+G+AT-3'	136	CSF, L-
LAS-LNA-RP2- Biotin	5'-Biotin-TGAACACCAGAAGA+A+ACG-3'		Segment
LAS-LNA-FP3	5'GTTTGTGCTTTAGAGATT+A+TG-3'	130	Mopeia,
LAS-LNA-RP3-Biotin	5'-Biotin-AATTGATTCCCCTCTT+C+T+T-3'		L-Segment
LAS-LNA-FP4	5'-CTGACTCACCAGTTTA+A+GA-3'	151	AV, (Z)
LAS-LNA-RP4-Biotin	5'-Biotin-TCCTCAACGACTT+A+A+CTT-3'		Zinkfinger- Protein, L-Segment

Tab. 2.8: Verwendete Sonden

Name der Sonde	Sequenz der Sonde	Schmelztemperatur T _M
RVFV-Sonde	5'-TCCTTCTCCCAGTCAGCCCCAC-3'	65,3°C
CCSMW-Sonde	5'-CTGAGCACHCCAATGAARTGGGG-3'	65,3°C
MARV-Sonde	5'-CCGTCCTCAGCCAGAAACGAGA-3'	65,3°C
EBOVZ-Sonde	5'-CCAGAGTTACTCGGAAAACGGCATG-3'	65,3°C
EBOVS-Sonde	5'-CCTGACTACGAGGATTCGGCTGAAGG-3'	65,3°C
YFV-Sonde	5'- AGTTGCTAGGCA+AT+A+A+A-3'	65,3°C
DENV-Sonde	5'-ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACC-3'	65,3°C
LASV-Sonde1	5'-ATTCCTACCATTGT+C+A+A+A+A+C+A-3'	68,0°C
LASV-Sonde2	5'-TTTGACACAATGATACTC+C+T+T+G-3'	67,0°C
LASV-Sonde3	5'-TAACATAAGCCTCTCGTA+A+C+T+G+T-3'	67,0°C
LASV-Sonde4	5'-TTCTGGATCGTCTTAA+C+A+A+T+G-3'	67,0°C
LASV-Sonde5	5'-GTCCTCTTCTCCCTCAA+T+A+T+C+T-3'	67,0°C

2.1.8 Verwendete Computerprogramme

Tab.2.9: Verwendete Computerprogramme für die Erstellung der Arbeit

Name	Hersteller	Anwendung
Adobe-Photoshop	Adobe Systems Inc.	Bildbearbeitung
Adobe-Illustrator	Adobe Systems Inc.	Bildbearbeitung
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	National Center for Biotechnology Information (NCBI 2011b)	Sequenzvergleich mit Sequenzdatenbank von allen öffentlich verfügbaren Genom-Sequenzen
BD FACSDiva™ Version 6.1.2	BD Biosciences	Primäre Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen
DNASTar LaserGene	DNASTar Inc., Madison WI, USA	Sequenzanalyse
EndNote X3	Thomson Reuters	Literaturverwaltung
Microsoft Office 2007	Microsoft Inc.	Text- und Datenverarbeitung
NCBI GenBank	National Center for Biotechnology Information (NCBI 2011a)	Sequenzdatenbank aller öffentlich verfügbaren Genom-Sequenzen
Primer Express	Applied Biosystems	Primer Entwicklung

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 RNS-Extraktion

Bei der RNS-Extraktion wurde die RNS von DNS und Proteinen getrennt um im Anschluss für weitere Experimente (z.B. Transkription in cDNS) verwendet werden zu können.

Die Isolierung der RNS wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem peqGOLD TriFast™FL – Reagenz durchgeführt, das auf der sogenannten “Acid Guanidinium-Thiocyanate-Phenol-Chloroform-Extraktion”-Methode von Chomczynski und Sacchi basiert (Chomczynski, Sacchi 1987).

Hierzu wurden 100 µl Probe (z.B. Zellkulturüberstand von infizierten Zellen) mit 300 µl Trizol (peqGOLD TriFast™FL von peqLab) versetzt. Dabei wurden die Viren inaktiviert und durch das Guanidinisothiocyanat, ein chaotropes Salz im Trizol, gleichzeitig RNasen und andere Enzyme deaktiviert. Im Anschluss wurden die Proben 5 min gevortext. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 80 µl Chloroform hinzugegeben. Daraufhin wurden die Proben nach kurzem Vortexen ein weiteres Mal bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation (12.000xg, 5 min) ließen sich drei Phasen im Eppendorfgemäß unterscheiden. Proteine und kleinere DNS-Fragmente wurden durch Phenol entfernt. Größere DNS-Fragmente sammelten sich nach der Zentrifugation in der Interphase, während die RNS nach der Zentrifugation in der wässrigen Phase blieb. Dieser wässrige Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgemäß gefüllt und 2 µl Glykogen (35 µg/µl) hinzugegeben. Die Probe wurde im Anschluss mit dem gleichen Volumen Isopropanol bei -20°C über Nacht präzipitiert.

Am nächsten Tag konnte die RNS nach zwei Waschschrirren mit 70%igem Ethanol in DEPC-behandeltem Wasser gelagert werden und stand für weitere Experimente zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde die RNS aus den LASV-Proben (LASV AV, CSF und Josiah), die vom Bernhard-Nocht-Institut gespendet wurden, auf beschriebene Weise gewonnen.

2.2.1.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der optischen Dichte (OD) mithilfe des Nanodrop Spektrophotometers. Ermittelt wurde die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für RNS entspricht eine A_{260} -Einheit von 1,0 OD einer Konzentration von 40 ng/ μ l einzelsträngiger RNS/ml (ssDNS: 33 ng/ μ l; dsDNS: 50ng/ μ l). Anhand der Absorption konnte somit die Nukleinsäurekonzentration ermittelt werden. Die Reinheit der Probe ließ sich dabei durch das Verhältnis von $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ errechnen. Nukleotide, ssDNS, dsDNS und RNS haben ein Absorptionsmaximum von 260nm, während das Absorptionsmaximum der Proteine bei 280 nm liegt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte für relativ proteinfreie DNS- bzw. RNS-Präparationen zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook 1989). Ein Wert unterhalb von 1,8 lässt eine Proteinverunreinigung vermuten.

Zur Bestimmung der RNS-Konzentration wurden jeweils 1,5 μ l der extrahierten LASV-RNS (LAS-AV1, LAS-Lib) (Kap. 2.2.1.1, S.31) verwendet und die gemessenen Werte vom Gerätecomputer (Nano Drop® ND-1000 Spektralphotometer, Thermo Scientific, Rockford, USA) abgelesen.

2.2.1.3 PCR-Amplifikation

2.2.1.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine effektive Methode zur *in-vitro*-Vervielfältigung von DNS (Mullis, Faloona 1987). Notwendige Materialien für die PCR sind:

- 1) Zwei Oligonukleotidprimer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer), die auf den gegenüberliegenden Strängen der DNS jeweils den Startpunkt der DNS-Synthese festlegen und damit die zu vervielfältigende Sequenz begrenzen. Die Primer sollten wichtige Eigenschaften, z.B. die richtige Schmelztemperatur T_M und GC-Gehalt, erfüllen (s. Kap. 2.2.1.3.4, S.37). Durch die freien OH'-Gruppen wird dabei der Startpunkt für die DNS-Polymerase-Reaktion festgelegt. Die DNS-Polymerase verknüpft die freien Nukleotide mit der OH'-Gruppe am 3'-Ende.

- 2) Eine DNS-Matrize, die den zu vervielfältigenden Abschnitt beinhaltet und 100 bis 5000 bp lang sein sollte. Bei dieser Arbeit wurden RNS-Matrizen verwendet, die erst durch eine reverse Transkription in cDNS umgeschrieben wurden.
- 3) Eine thermostabile DNS-Polymerase. Meist wird die Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wurde, verwendet.
- 4) Die 4 Desoxyribonukleotide (dNTPs).
- 5) Mg^{2+} -Ionen, die bei der PCR mehrere Funktionen erfüllen: sie stabilisieren die spezifische und unspezifische Anlagerung der Primer an die Templates, sie bilden lösliche Komplexe mit den dNTPs und sie wirken als Cofaktoren der DNS-Polymerase.

Diese spezifische primer-abhängige Amplifizierung der DNS findet in sich wiederholenden Zyklen statt, die in drei Stufen unterteilt werden: Denaturierung, Renaturierung („Annealing“) und Synthese (Elongation):

1. Denaturierung:

Zur thermischen Denaturierung der DNS-Probe wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt. Auf diese Weise wird der Doppelstrang in zwei Einzelstränge getrennt.

2. Renaturierung (engl.: *annealing*):

Zur Primeranlagerung (engl.: *primer annealing*) muss der Ansatz nun auf eine Temperatur gebracht werden, die abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der jeweiligen Primersequenzen ist. Meist entspricht sie einer Temperatur von ca. 55-65°C.

3. Synthese (Elongation):

Zuletzt kommt es zur Verlängerung des komplementären DNS-Stranges. Die Polymerase beginnt am 3'OH-Ende der Primer die DNS-Sequenz zu verlängern, indem sie die 4 dNTPs entlang der einzelsträngigen denaturierten DNS-Matrize komplementär anlagert. Meist wird hier 72°C als optimale Temperatur für die Taq-Polymerase gewählt.

Jeder Zyklus bedeutet eine weitere Verdopplung der bereits bestehenden DNS-Doppelstränge, da auch die neusynthetisierten Stränge als Matrize dienen. Auf diese Weise kommt es zu einem exponentiellen Konzentrationsanstieg der zu amplifizierenden Sequenz.

In dieser Arbeit wurde das PCR-Verfahren zur Amplifikation von RNS von acht HFV (RVFV, CCHFV, MARV, EBOZV, EBOSV, YFV, DENV, LASV) verwendet, die anschließend an beadgekoppelte Sonden hybridisiert wurden. Dabei wurde eine Multiplex-PCR-Technik verwendet, die die simultane Amplifikation mehrerer Sequenzen gleichzeitig ermöglicht (s. Kap .2.2.1.3.3, S.35).

Die Reaktion erfolgte in dünnwandigen 0.5-ml-Reaktionsgefäßen in einem automatischen Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) oder Speedcycler (Analytic Jena, Jena, Deutschland) mit beheizbarem Deckel. Im Anschluss wurden die Amplifikationsprodukte durch TAE-Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.1.3.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um die Amplifikation und Detektion von RNS-Viren zu ermöglichen wurde die RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) angewendet.

Die RT-PCR besteht aus zwei Schritten: der reversen Transkriptionsreaktion und der PCR-Amplifikation (s. Kap.2.2.1.3.1, S.32). Zuerst wurde dabei die virale RNS durch ein Enzym, die Reverse-Transkriptase, in cDNS umgeschrieben. Diese cDNS diente in der darauf folgenden PCR als Matrize für die Amplifikation.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem *QuantiTect®-Multiplex-RT-PC-Kit* gearbeitet. Durch die Reverse-Transkriptase, die im *QuantiTect®-RT-Mix* enthalten war, wurde in einem 20 minütigen Schritt bei 50°C zu Beginn des PCR-Programms die virale RNS in cDNS umgeschrieben.

2.2.1.3.3 Multiplex-RT-PCR

Für den simultanen Nachweis von mehreren Viren in einem PCR-Ansatz wurde die Amplifikation im Multiplex-System durchgeführt.

Durch die Zusammenstellung von multiplen Primerpaaren konnten auf diese Weise mehrere Proben in einem einzigen Ansatz analysiert werden, die sonst in mehrere zeitaufwendige Einzelversuche aufgeteilt werden müssten. Für eine effiziente Multiplex-PCR mussten verschiedene Bedingungen erfüllt werden:

- Für die Multiplex-PCR musste die Renaturierungstemperatur (T_a) (engl.: *annealing temperature*) so gewählt werden, dass sie den jeweiligen Eigenschaften aller Primerpaare in einem Ansatz entspricht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Renaturierungstemperatur von 60°C ausgewählt.
- Die Amplikons sollten sich in der Länge unterscheiden, damit sie bei der gelelektrophoretischen Auftrennung im Anschluss an die PCR differenziert werden konnten. Die Amplikons in dieser Arbeit wiesen eine Länge von ca. 70 bp-180 bp auf.
- Die Primer durften keine homologen Sequenzen amplifizieren und mussten bei jedem Primermix auf Primerdimerbildung mit Hilfe der SYBR-Green-qRT-PCR (s.Kap. 2.2.1.3.6.2, S.41) kontrolliert werden. Um die Spezifität und Sensibilität der einzelnen Primerpaare zu überprüfen wurde die qRT-PCR verwendet (s. Kap. 2.2.1.3.6.1, S.41)

Insgesamt wurden drei Primermischungen für Multiplex-PCR-Reaktionen entwickelt: Mix 1 setzte sich aus drei Primerpaaren für RVFV, CCHFV, MARV zusammen, Mix 2 aus vier Primerpaaren für EBOZV, EBOSV, YFV, DENV und Mix 3 aus fünf Primerpaaren für LASV.

Tab. 2.10: Primermixe für Multiplex-PCR

MIX 1	MIX 2	MIX 3
RVF-FP	EBOZ-FP2	LAS-LNA-FP1
RVF-RPptr	EBOZ-RP2	LAS-LNA-RP1
CCSMW-FP	EBOS (ENS)-FP	LAS-LNA-FP2
CCSMW-RP	EBOS (ENS)-RP	LAS-LNA-RP2
MAR-FP2	YFV-FP	LAS-LNA-FP3
MAR-RP2	YFV-RP	LAS-LNA-RP3
	DEN-FP	LAS-LNA-FP4
	DEN-RP2	LAS-LNA-RP4

Die Multiplex-PCRs in der vorliegenden Arbeit wurden mit dem *QuantiTect®-Multiplex-RT-PCR-Kit* von QIAGEN durchgeführt, das die optimale Konzentration an Mg^{2+} , Taq DNS Polymerase und Reverse-Transkriptase bereits enthielt. Dieses Reaktionskit enthielt die *HotStar Taq DNS Polymerase*, eine chemisch modifizierte DNS Taq-Polymerase, die erst ab 95°C aktiviert wurde. Zur Aktivierung wurde deshalb ein Schritt von 15 min bei 95°C vor den PCR-Zyklen eingefügt.

Für sämtliche Polymerase-Kettenreaktionen der vorliegenden Arbeit wurde dabei folgendes PCR-Programm gewählt:

Temperaturprogramm der PCR:

50°C (20 min)		Reverse Transkription
95°C (15 min)		Aktivierung der HotStar Taq Polymerase
94°C (45 sek)	}45x	Denaturierung
60°C (75 sek)		Renaturierung und Polymerisierung
40°C (30 sek)		Abkühlung
12°C (∞)		Stand-by

Beispiel: PCR-Ansatz für MIX 1 (Master Mix 4:1 FP/RP-Verhältnis):

	Stock- konzentration	End- konzentration	1x Ansatz (μl)
H ₂ O			5,8
QuantiTect® NoRox Master	2x		10
RVF-FP	10 μ M	400nM	0,8
RVF-RPptr-Biotin	10 μ M	100nM	0,2
CCSMW-FP	10 μ M	400nM	0,8
CCSMW-RP-Biotin	10 μ M	100nM	0,2
MAR-FP	10 μ M	400nM	0,8
MAR-RP-Biotin	10 μ M	100nM	0,2
QuantiTect® RT Mix	100x	100nM	0,2
Σ Volumen			20

2.2.1.3.4 Primer- und Sondendesign

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer und Sonden beruhen auf durch die *AG Weidmann* veröffentlichten Einzelamplikons zum Nachweis von DENV, RVFV, EBOZV, EBOSV, MARV, YFV (Kap 2.1.7) (Carhan et al. 2010, Wagner et al. 2004, Weidmann et al. 2004, Weidmann et al. 2008), die wie beschrieben unter der Verwendung folgender Software entworfen wurden (Alignments mit DNASTAR Lasergene Software, Primer Entwicklung mit Primer Express). Im Einzelfall wurden Primer verändert (RVFV-RVptr, EBOVZ-FP2 und EBOVZ-RP2) und angepasst. Die Primer und die Sonde für CCHFV wurden neu synthetisiert. Für LASV wurden die Primer und Sonden nach dem Algorithmus von Gardner et al. ausgewählt (Gardner et al. 2004) und von Prof. Stephan Günther vom Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg zur Verfügung gestellt. Um die Variationsbreite der LASV abzudecken wurden Primerpaare für Amplikons basierend auf 5 LASV-LNA Sonden mit der genomischen RNS der LASV-Stämme LASV JOS, LASV LANT (westliches West-Afrika), LASV AV (zentrales West-Afrika), LASV CSF (östliches West-Afrika) getestet.

Die Virus-RNS-Proben waren großzügige Spenden des Robert-Koch-Instituts (AV1, Stamm Liberia (Lib)), des Bernhard-Nocht-Instituts (Josiah (JOS), Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), AV) und von Dr. Ali Mirazimi vom Department of Virology des „Swedish Institute for Infectious Disease Control“ in Solna, Schweden (Josiah (JOS), LANT).

Zum Nachweis einer erfolgreichen Hybridisierungsreaktion an die gekoppelten Beads wurden biotinylierte RP verwendet. Durch das Biotin wurde eine Bindung an den

Fluoreszenzfarbstoff SARPE (Streptavidin-R-Phycoerythrin) ermöglicht, der in der Durchflusszytometrie detektiert werden konnte.

Synthetisiert wurden diese Primer und Sonden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland). Nach dem Erhalt der lyophilisierten Primer und Sonden mussten diese in H₂O gelöst werden. Die Aufbewahrung der aliquotierten Primer (Konzentration: 10 µM) und Sonden (Konzentration: 100 µM) fand bei -20°C statt.

2.2.1.3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

Zur analytischen Trennung von DNS-Fragmenten werden die Amplifikationsprodukte im Anschluss an das PCR-Verfahren auf ein Agarose-Flachbettgel aufgetragen. Da die DNS-Fragmente negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der doppelsträngigen DNS ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes (Helling et al. 1974).

Abhängig von der Größe der zu trennenden DNS-Fragmente wird die Agarosekonzentration gewählt.

Agarosekonzentration	Größe der DNA-Fragmente
0.7 %	12 kb – 800 bp
1.0 %	10 kb – 500 bp
1.5 %	3 kb – 200 bp
2.0 %	2 kb – 50 bp

Da die Länge der Amplifikationsprodukte in dieser Arbeit bei 70bp -180bp lag, wurde eine Agarosekonzentration von 2% (w/v) verwendet. Durch Aufkochen wurde die Agarose in TAE-Puffer gelöst. Nachdem sie auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugegeben. Beim Gießen der gelösten Agarose in eine entsprechende Gelkammer werden durch das Aufsetzen eines Kammes Taschen für den Probenauftrag freigehalten.

Die Amplifikationsprodukte wurden mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (Orange Loading Dye (6x)) versetzt und in die Taschen des TAE-Puffer-bedeckten Gels pipettiert. Dieser Auftragspuffer enthielt zwei Farbstoffe, die es ermöglichten die DNS-Fragmente bei ihrer

Bewegung im elektrischen Feld zu verfolgen. Zur anschließenden Analyse der Größe der DNS-Fragmente dienen zwei zusätzlich aufgetragene Längenstandards (100bp, Ultra-low-range).

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 95V in 1x TAE-Puffer. Da das Ethidiumbromid in die Doppelstränge der DNS interkaliert, konnten die DNS-Fragmente durch den Chemidoc™ XRS bei einer Bestrahlung mit UV-Licht (302nm) sichtbar gemacht werden. Die Nachweisgrenze der Ethidiumbromid-gefärbten Gele lag bei 10ng DNS pro Bande. Die Agarosegele wurden auf dem Chemidoc™ XRS System mit Hilfe eines Videosystems dokumentiert

50x TAE-Puffer

242,2g Tris

18,61g EDTA

Mit Eisessig auf pH 7,9 einstellen

→ Auf 1l mit H₂O

6x Auftragspuffer

10mM Tris-HCl (pH 7,6)

0,15% Orange G

0,03% Xylene Cyanol FF

60% Glycerol

60mM EDTA

2.2.1.3.6 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time-PCR bietet die Möglichkeit bereits während des Amplifikationsvorganges die aktuelle Verfügtung der DNA-Fragmente zu beobachten. Die qRT-PCR basiert auf dem gleichen Verfahren wie die klassische PCR und macht sich dabei die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zu nutze. Die sogenannte Taqman Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszin-Derivat, FAM) und dessen 3'-Ende mit einem Lösch-Farbstoff (engl.: *quencher-dye*, Rhodamin-Derivat, TAMRA) markiert ist. Wird die Sonde mit einer spezifischen Wellenlänge (488nm) bestrahlt, bleibt das Reporter-Fluoreszenzsignal durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt. Es kommt zu einem Fluoreszenz-Energietransfer (FRET). Während der PCR hybridisiert die Taqman-Sonde an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase verdrängt die Polymerase mit ihrer 5'-3'-Exonuklaeseaktivität die Sonde und baut diese ab, wodurch es zu einer

Trennung von Reporter und Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird.

Die Taq-Polymerase baut nur gebundene Sonden ab, sodass Einzelstränge, an die keine Sonde hybridisiert hat, unbeschadet bleiben. Die Reporterfluoreszenz ist proportional zu den DNS-Templates in der Probe und wird nach jedem Zyklus gemessen.

Zur Datenvalidierung wurde der Zyklus-Schwellenwert (engl.: *cycle-threshold*, Ct) analysiert, da dieser Wert den Punkt in der Phase des exponentiellen Wachstums beschreibt, an dem die Fluoreszenzintensität der Reaktion oberhalb der Negativkontrollwerte liegt.

In dieser Arbeit ist die quantitative Real-Time-PCR zur Sensitivitätskontrolle der drei Primermixe (MIX 1, MIX 2, MIX 3 s. Kap. 3.1.2, S.48) genutzt worden. Darüber hinaus konnten durch den Einsatz von SYBR-Green anstelle der TaqMan-Sonde in der qRT-PCR mögliche Primerdimerbildung der verschiedenen Primerkombinationen ausgeschlossen werden (s. Kap. 2.2.1.3.6.2, S.41).

Tab. 2.11: Beispielprotokoll für qRT-PCR

	Stock-Konz.	End-Konz.	1x Ansatz (µl)
QuantiTect® Multiplex NoRox Master	2x	1x	10,0
H ₂ O			8,0
Primer-FP	10µM	100nM	0,2
Primer-RP	10µM	100nM	0,2
Sonde P	10µM	200µM	0,4
QuantiTect® Multiplex-RT-Mix			0,2
RNS-Standard			1,0
Σ Volumen			20,0

Tab. 2.12: PCR-Programm für qRT-PCR

50°C (5 min)		Reverse Transkription
95°C (15 sek)		Aktivierung der HotStar Taq Polymerase
94°C (5 sek)	}45x	Denaturierung
60°C (50 sek)		Renaturierung und Polymerisierung
40°C (30 sek)		Abkühlung
12°C (∞)		Stand-by

2.2.1.3.6.1 Sensitivitätstestung mittels Real-Time PCR

Die Validierung der entwickelten Primermixe erfolgte anhand von seriellen Verdünnungsreihen der RNA-Standards. Die Ausgangskonzentration betrug 10^7 RNS-Moleküle/ μl , woraus eine Verdünnungsreihe von 10^6 bis 10^1 erstellt wurde. Mit diesen RNS-Standards konnten im Anschluss qRT-PCRs (s. Kap. 3.1.1, S.46) im Multiplex-System für die drei Primermixe durchgeführt werden. Mithilfe des Zyklus-Schwellenwertes (CT) der einzelnen Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen konnte die Sensitivität des gesamten Mixes ermittelt werden.

2.2.1.3.6.2 Detektion von Primerdimerbildung mittels Real-Time PCR

Zum Nachweis von Primerdimeren kann der Farbstoff SYBR-Green in der Real-Time-PCR verwendet werden. Dieser Cyanin-Farbstoff bindet unspezifisch an doppelsträngige DNS und emittiert grünes Licht bei der Bestrahlung einer Wellenlänge von 521nm. Der qRT-PCR-Ansatz wird zur Primerdimerkontrolle nur mit Primern und ohne DNS-Fragmente durchgeführt, sodass mögliche detektierte dsDNS nur durch Primerdimerbildung entstehen kann. Dabei wird der CT-Wert gemessen, der Angaben über die Menge des Produktes gibt. Die Primermischungen werden dabei stufenweise durch einen zusätzlichen Primer ergänzt. Bei einer Verschiebung des CT-Wertes kann somit der Dimer-bildende Primer sofort ermittelt werden. Das bei der SYBR-Green-qRT-PCR verwendete PCR-Programm entsprach dem Protokoll in Tab. 2.13.

Tab. 2.13: Beispielprotokoll für SYBR-Green-qRT-PCR

	Stock-Konz.	End-Konz.	1x Ansatz (μl)
RNA Master SYBR Green	2,7x	1x	7,5
Mn(OAc) ₂	50nM	3,25nM	1,3
H ₂ O			9,8
Primer-FP	10 μM	100nM	0,2
Primer-RP	10 μM	100nM	0,2
RNS-Standard			1,0
Σ Volumen			20,0

Tab. 2.14: PCR-Programm für SYBR-Green-qRT-PCR

61°C (20 min)		Reverse Transkription
95°C (2 min)		Aktivierung der HotStar Taq Polymerase
95°C (5 sek)	}45x	Denaturierung
60°C (50 sek)		Renaturierung und Polymerisierung
40°C (30 sek)		Abkühlung
12°C (∞)		Stand-by

2.2.2 Cytometric Bead Array (CBA)

2.2.2.1 Aufreinigung der PCR-Produkte mit MinElute-Purifikation-Kit

Um spezifische DNS-Fragmente nach der PCR-Reaktion zu isolieren, wurden PCR-Amplifikate mit dem MinElute-Purification-Kit von QIAGEN gereinigt. Während dieses Vorganges wurden alle Nukleinsäuren, kleiner als 70 bp bzw. größer als 4kb, entfernt. Zusätzlich wurden alle Enzyme, unabhängig von ihrer Größe, aus der Probe gefiltert. Das gereinigte Produkt wurde im Anschluss für weitere Versuche wie Ligation, Transkription, Amplifikation oder Hybridisierung verwendet.

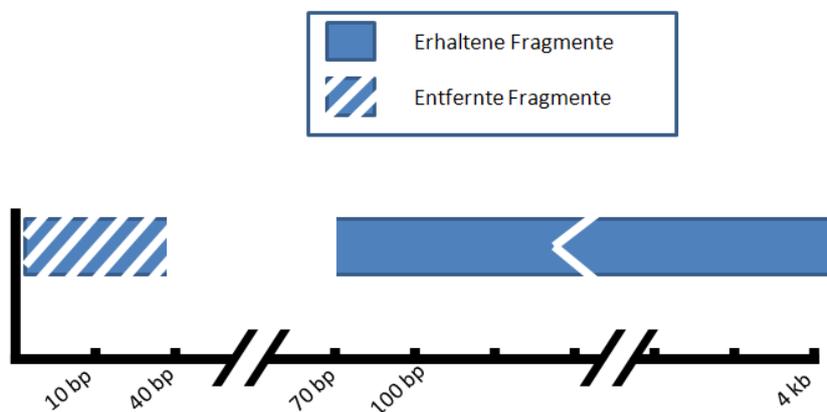


Abb. 2.1: **Reinigung der DNS mit dem MinElute-Purifikation-Kit von QIAGEN**, Nukleinsäuren <70bp und >4kb werden aus der Probe entfernt.(QIAGEN 2010)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde während der Reinigung mit dem MinElute-Purifikation-Kit ein weiterer Waschschriff mit 750µl Guanidiniumhydrochlorid (35%) durchgeführt, um Primerdimere, die >20bp waren, effizienter zu entfernen.

2.2.2.2 Kopplung von Sonden an carboxylierte Beads

Zur Hybridisierung der PCR-Produkte an die Beads mussten zuerst Oligonukleotidsonden an die Beads gekoppelt werden. Das dabei verwendete Verfahren zur Kopplung basierte auf den Erfahrungen von Deregt et al. aus 2006.

Zu Beginn wurden die carboxylierten Beads (Bio-Plex COOH-Beads) in der Originalverpackung erst für 30 sek gevortext und dann für 30 sek ins Ultraschallbad (Bandelin electronic) gestellt. Danach wurden 1,25 Mio. Beads (= 100 μ l of $1,25 \times 10^7$ Beads/ml) in ein Eppendorfgefäß überführt um für 4 min in der Zentrifuge (14.000xg) pelletiert zu werden. Das Pellet wurde in 100 μ l 0,1M 2-Morpholinoethan Sulfonsäure (MES, pH 4,5) resuspendiert. Von der aminierten Oligonukleotidsonde wurden 400 pmol hinzugefügt. Gefolgt wurde dieser Schritt von der Zugabe von 10 μ l (= 200 μ g) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDAC) (20 mg/ml), das zuvor in 0,1 M MES, pH 4,5 aufgelöst worden war. Das EDAC wirkt als Carboxylgruppenaktivator, da es die COOH-Gruppen in den instabilen O-Acylsäureester überführt, der eine kovalente Bindung mit dem primären Amid einght. Ergänzend kann durch die Zugabe von N-Hydroxysuccinimid (NHS) ein Übergang in den halb-stabilen NHS-Ester-Zustand herbeigeführt werden, der ebenfalls eine kovalente Amid-Verbindung mit einem primären Amin bildet. Dieser stabilisierende Übergang ist allerdings nicht zwingend notwendig zur Ausbildung der Amid-Bindung.

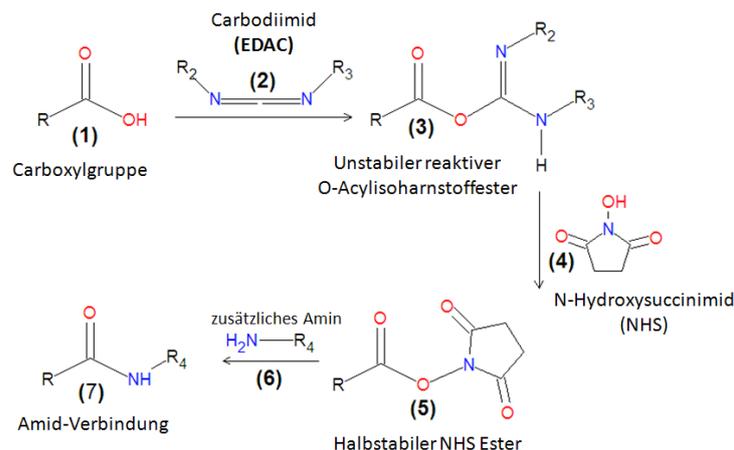


Abb. 2.2: **Kopplungsreaktion von Carboxylsäure an ein primäres Amin über die Zwischenprodukte O-Acylsäureester und NHS-Ester**, die Kopplung in Form einer Peptidbindung geschieht durch die Bildung eines instabilen Zwischenprodukts, dem O-Acylisoharnstoffester, durch die Reaktion der Carboxylgruppe mit dem Carbodiimid des EDACs. Zur Stabilisierung des O-Acylisoharnstoffesters wird häufig NHS hinzugegeben, sodass durch die Zugabe eines weiteren Amins die stabile Amidverbindung entsteht. (Volk 2009)

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 30 min auf dem Rotator inkubiert. Die Inkubation wurde dabei nach 15 min kurz unterbrochen um die Probe auf dem Vortexer ein weiteres Mal zu mischen. Um die Effizienz der Konjugation abzusichern, wurde die Zugabe von EDAC (200 µg), die Inkubation (30 min, Raumtemperatur) und die kurze Unterbrechung zum Vortexen wiederholt. Da EDAC auf Raumtemperatur äquilibriert werden musste, sollte es 1 Stunde vor Gebrauch auf Raumtemperatur gelagert werden und vor jeder Zugabe neu angesetzt werden. EDAC ist ein aminreaktiver Kreuzvernetzer (engl: *cross-linker*), der die Peptid-Bindung zwischen den Carboxylgruppen der Beads und den Aminogruppen der Oligonukleotidsonden erleichtert.

Nach der zweiten Inkubation wurde die Probe wieder für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dann mit 0,5 ml 0,02% Tween 20 gewaschen, d.h. nach der Zugabe von Tween 20 wurde die Probe gevortext, wieder pelletiert (14.000xg, 4 min) und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde die Reaktion in 0,5 ml 0,1% SDS (w/v) (Sodiumdodecylsulfat) resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert (14.000xg, 4 min). Nach der Abnahme des Überstandes, wurden die Beads zum Schluss in 50 µl Tris-EDTA (pH 8,0) resuspendiert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Zur Kontrolle der Kopplungsreaktion wurde in einer Parallelreaktion statt der üblichen Oligonukleotidsonde eine Sonde verwendet, die den Farbstoff Cy3 (Emissionsmaximum: 575nm) enthielt. Mit Hilfe dieses Fluoreszenzsignals konnte eine positive Kopplungsreaktion mit dem Durchflusszytometer (FACS Canto™ II) nachgewiesen werden.

2.2.2.3 Hybridisierung an Beads und Detektion

Zum Direktnachweis von Virusgenomen im Serum per CBA (s. Kap. 2.2.2, S.42) wurde wie folgt verfahren.

Die PCR Produkte wurden zuerst 1:2 mit Tris-EDTA (pH 8,0) verdünnt. Je Ansatz wurden dann 5 µl der verdünnten PCR-Produkte für 5 min bei 96°C im ThermoCycler denaturiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden die Proben im Anschluss sofort für 1-2 min auf Eis gestellt. Danach wurden 5 µl der mit Sonden gekoppelten Beads (s. Kap.2.2.2.2, S.43) zugegeben und durch Agitation mit der Pipette vermischt. Der Hybridisierungsschritt

erfolgte im Anschluss bei 60°C für eine Stunde im SpeedCycler oder im ThermoCycler. Um den Beadverlust während der folgenden Waschschrte zu verringern, wurden die Proben nach der Hybridisierung in eine 96-well-Platte überführt. Nachdem der Zugabe von je 50 µl 0,02% Tween 20 in FACS-Flow hinzugegeben worden waren, wurden die 96-well-Platte bei 14.000xg für 4 min in einer Megafuge 1.0R zentrifugiert. Durch die Zugabe von je 50 µl 10% BSA wurden die Carboxylgruppen der Beads abgesättigt, um unspezifische Bindungen im weiteren Verlauf des Experiments zu verhindern (Kap. 3.3.1.1, S.60). Nach einer Inkubation von 30 min auf der Wippe lichtgeschützt durch Alufolie, wurden nochmals 50 µl 0,02% Tween in FACS-Flow zugegeben. Zur späteren Detektion der hybridisierten Proben wurden 100 µl Streptavidin-R-phycoerythrin (SARPE), das zuvor in 0,02% Tween 20 in FACS-Flow (10 µg/ml) verdünnt worden war, verwendet. Auf diesen Schritt folgten eine Inkubation auf der Wippe von 15 min und zwei Waschschrte mit jeweils 100 µl 0,02% Tween 20 in FACS-Flow mit einer Zentrifugation (14.000xg für 4 min). Zum Schluss wurden die Pellets in 200 µl 0,02% Tween 20 in FACS-Flow resuspendiert.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACS Canto™ II durchgeführt. Dieses acht-parametrische Analysegerät ermöglichte die gleichzeitige Messung von Streulichteigenschaften, Zellgröße, Zellgranularität und Fluoreszenz bei bis zu sechs Wellenlängen gleichzeitig. Mithilfe der BD FACS Diva™ Software Version 6.1.2. konnten die gewonnen Daten ausgewertet werden. Dabei musste man berücksichtigen, dass es sich bei den im Durchflusszytometer ermittelten Werten nicht um Absolutwerte, sondern um relative Signalgrößen handelte, die lediglich einen Vergleich der gemessenen Werte untereinander erlaubte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die internen Fluoreszenzsignale (APC, APC-Cy7) der Beads zur Detektion von 1000 Kugeln pro Ansatz verwendet und jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des SARPE zum Nachweis von viralen Genomen von HFV bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Amplifikation des Virusgenoms mittels PCR

3.1.1 Bestimmung der optimalen Primerkonzentration

Da Primerdimere eine Multiplex-PCR kompetitiv inhibieren können, sollte durch die Bestimmung der optimalen Primerkonzentration in der Multiplex-PCR die Primerdimerentwicklung minimiert werden. Die Entwicklung von Primerdimeren konnte in den verschiedenen Primermischungen mit SYBR-Green-qRT-PCR (Kap. 2.2.1.3.6.2, S.41) analysiert werden, da der Farbstoff SYBR-Green unspezifisch in doppelsträngige DNS interkaliert. Da es sich bei dieser SYBR-Green-qRT-PCR um eine Uniplex-Amplifikation handelte, enthielten die Proben jeweils nur ein Primerpaar mit einem symmetrischen Verhältnis von Forward-Primer zu Reverse-Primern (FP/RP-Verhältnis: 1:1) in unterschiedlichen Konzentrationen (100nM-200nM-300nM-400nM-500nM). Anstatt eines RNS-Standards wurde zu den Proben je 1 µl H₂O hinzugefügt. Die Primerdimerbildung bei den PCR-Mischungen wurde für EBOVZ, EBOVS und MARV ermittelt.

Die geringste Primerdimerbildung trat bei einer symmetrischen Primerkonzentration von 100nM auf.

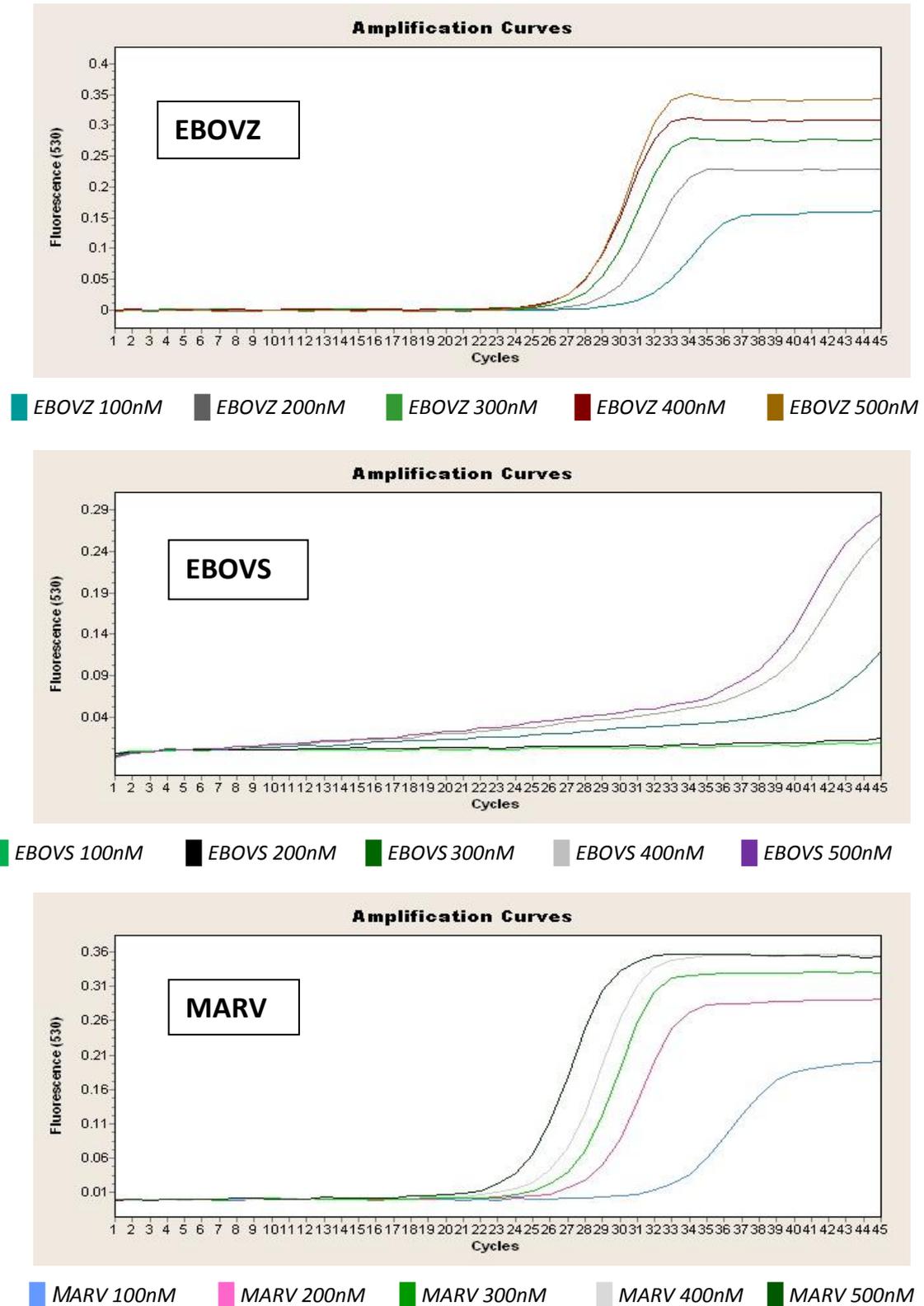


Abb. 3.1: **Bestimmung der optimalen Primerkonzentration in der Uniplex-PCR** von EBOVZ, EBOVS und MARV mittels SYBR-Green-qRT-PCR. Pro HFV wurden jeweils 5 Primerpaare mit unterschiedlichen Konzentrationen (100nM, 200nM, 300nM, 400nM, 500nM) am LightCycler® ausgewertet.

3.1.2 Bestimmung der optimalen Primerkombination

Mit der Anzahl der Primerpaare in einer Multiplex-PCR steigt das Risiko der Primerdimerbildung. Um die Anzahl von Primerpaaren gering zu halten (3-5 Paare/Multiplex-PCR) wurden die Mischungen sorgfältig aufeinander abgestimmt. Nachdem in der Uniplex-PCR für die Konzentration von 100nM eine minimale Primerdimerentwicklung nachgewiesen wurde (s. Kap. 3.1.1, S.46), konnte diese Konzentration als Grundlage für die Testung der optimalen Primermischungen der Multiplex-PCRs festgelegt werden. In einer SYBR-Green-qRT-PCR ohne Templates nach dem Protokoll in Kap. 2.2.1.3.6.2 (S.41) wurden die Primerkombinationen miteinander verglichen. Ursprünglich war ein Ansatz (Mix 1-a) für die *Bunyaviren* (RVFV, CCHFV) und dem *Flavivirus* (YFV) und ein weiterer Ansatz (Mix 1-b) für die *Filoviren* (EBOVZ, EBOVS, MARV) geplant. Um die Dimerbildung innerhalb dieser Ansätze zu verringern, wurden die Primer von YFV und MARV nach der Analyse der SYBR-Green-qRT-PCR gegeneinander ausgetauscht (Mix 1-b und Mix 2-b).

Bei der genaueren Betrachtung der quantitativen Analyse in Abb 3.2 fällt ein Sprung des Ct-Wertes in Mix 1-a bei der Zugabe von RVFV-RP auf, in Mix 1-b bei der Zugabe von dem CCSMW-RP. Bei Mix 2 treten ebenfalls Ct-Sprünge auf: ein Sprung im Ct-Wert bei Mix 2-a durch die Zugabe von MBR-RP2 und bei Mix 2-b durch die Zugabe von YFV-FP. Doch durch das Austauschen von MARV mit YFV konnte die Dimerbildung in Mix 1-b im Vergleich zu Mix 1-a verringert werden, während sie bei Mix 2-b unverändert zu Mix 2-a war. Für die endgültigen Primermixe wurden aus diesem Grund folgende Kombinationen festgelegt: RVFV, CCHFV und MARV als Mix 1 und EBOVZ, EBOVS und YFV als Mix 2 (s. Abb. 3.3).

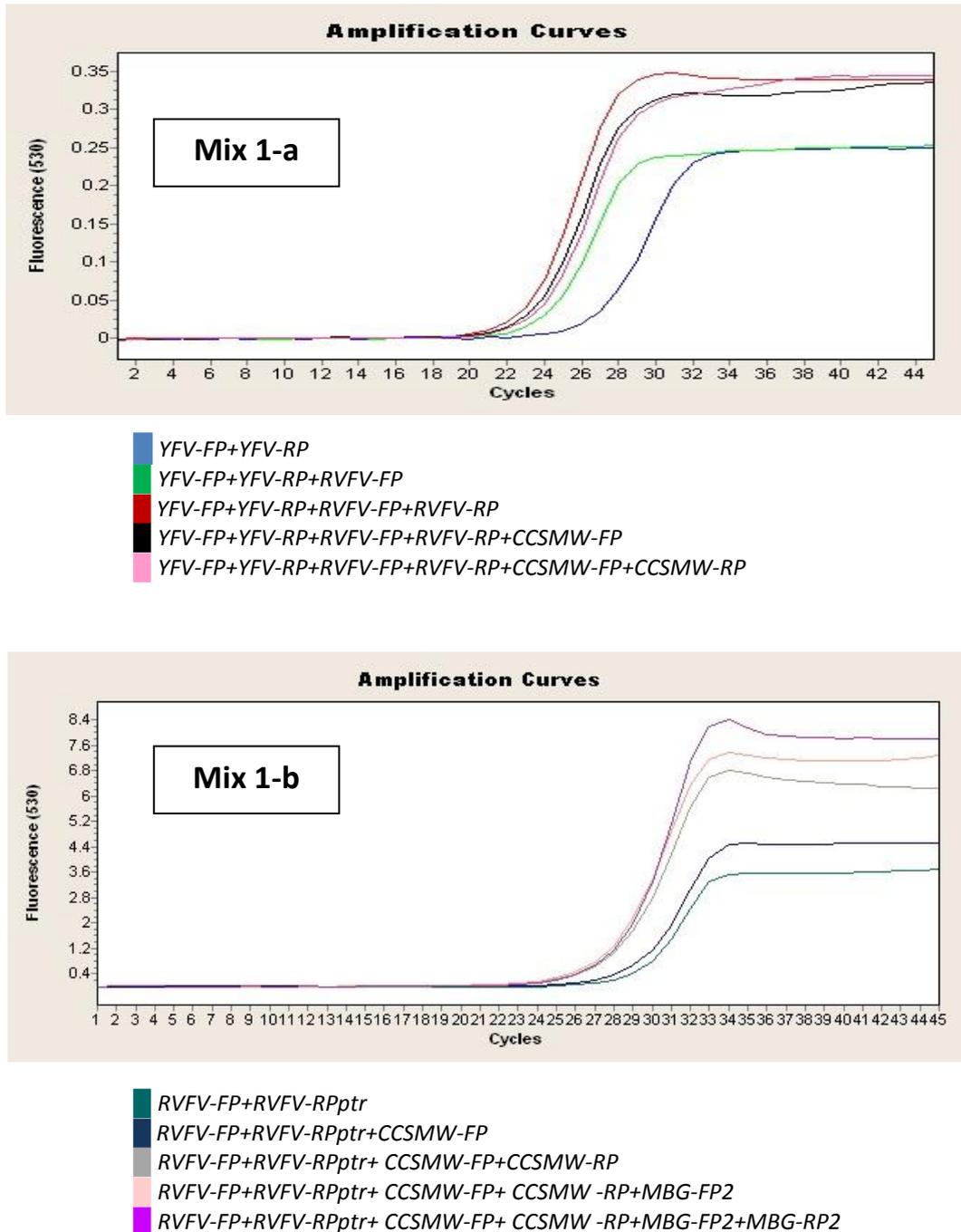


Abb. 3.2: **Bestimmung der Primerdimerbildung einer SYBR-GREEN-qRT-PCR für unterschiedliche Primerkombinationen in Mix 1.** Mix 1-a enthält eine Primerkombination aus RVFV-CCHFV-YFV und Mix 1-b besteht aus den Primern für RVFV-CCHFV-MARV. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Der Versuch wurde ohne RNS-Templates durchgeführt.

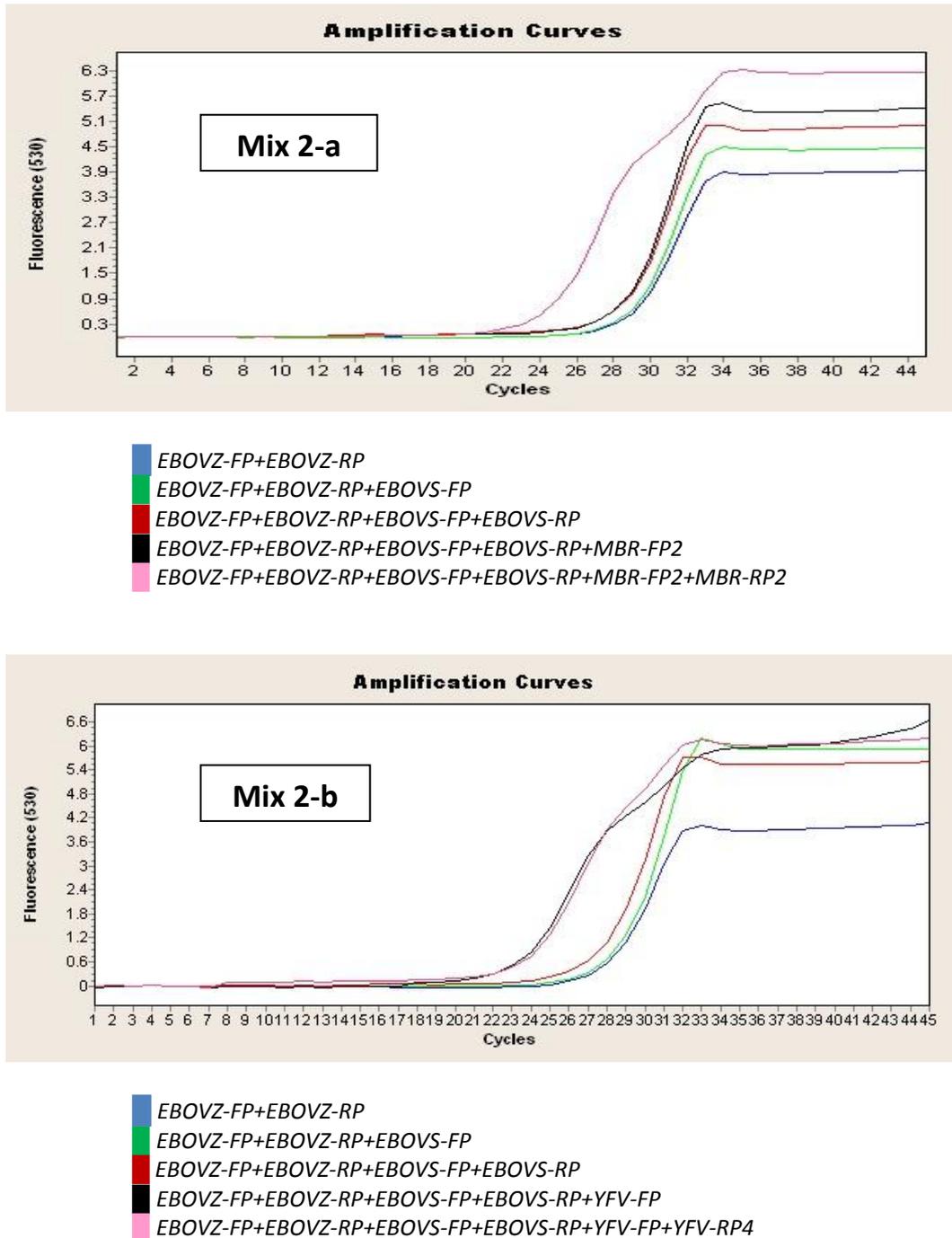


Abb. 3.3: Bestimmung der Primerdimerbildung einer SYBR-GREEN-qRT-PCR für unterschiedliche Primerkombinationen in Mix 2. Mix 2-a enthält eine Primerkombination aus EBOVZ-EBOS-MARV und Mix 2-b besteht aus den Primern für EBOVZ-EBOVS-YFV. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Der Versuch wurde ohne RNS-Templates durchgeführt.

DENV wurde verspätet in den CBA mit aufgenommen, sodass Mix 1 und Mix 2 nach Zuführen der zusätzlichen Primer erneut auf Dimerbildung getestet wurden. Um zu entscheiden, in welchen Mix die zusätzlichen DENV-Primer mit aufgenommen werden

sollte, wurden Multiplex-RT-PCRs nach dem Protokoll in Kap. 2.2.1.3.3 (S.35) mit Primermix 1 (RVFV, CCHFV, MARV) und mit Primermix 2 (EBOVZ, EBOVS, YFV) angesetzt. Als Template diente der DENV-Standard in zwei Konzentrationen (10^4 Moleküle/ μ und 10^6 Moleküle/ μ l). Auf dem Agarosegel zeigten die Amplifikationsprodukte des DENV-Nachweises in Mix 2 deutliche spezifische Banden (87bp) und gleichzeitig schwächere unspezifische Banden als in der Kombination mit Mix 1. Die unspezifischen Banden, die vermutlich durch eine Primerdimerbildung entstanden, waren in Mix 1 stärker ausgeprägt (s. Abb. 3.4). Aus diesem Grund wurden die Primer von DENV in den Mix 2 mit aufgenommen.

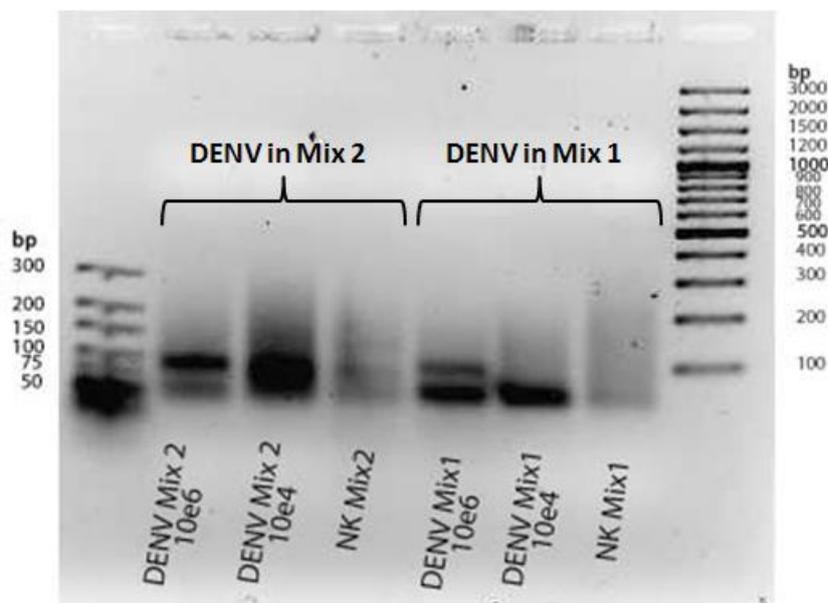


Abb. 3.4: Vergleich der Multiplex-RT-PCR für DENV mit Primermix 1 (RVFV, CCHFV, MARV) und mit Primermix 2 (EBOVZ, EBOVS, YFV). Der Vergleich wurde mit dem DENV-Standard in den Konzentrationen von 10^4 Moleküle/ μ und 10^6 Moleküle/ μ l durchgeführt. Die Kombination mit den Primern aus Mix 2 erwies sich als sensitiver und zeigte deutlichere spezifischere DENV-Banden (87bp). Es wurden pro Spur 10 μ l PCR-Probe bzw. 5 μ l DNA-Ladder (Größe 10-300 bp bzw. 100-3000 bp) auf 2%iges Agarosegel aufgetragen.

3.1.3 Vergleich der Primerdimerbildung in den Primermischungen

Zur Überprüfung der Primerdimerbildung in den drei Primermischungen (Mix 1, 2, 3) wurde eine SYBR-Green-qRT-PCR nach dem Protokoll aus Kap. 2.2.1.3.6.2 (S.41) durchgeführt. Insgesamt wurden für jeden Mix eine Probe und eine Negativkontrolle angesetzt und im Anschluss im LightCycler® ausgewertet. Die Proben enthielten jeweils die entsprechenden Forward- und Reverse-Primer des Mixes (Konzentration von 100nM)

(Kap. 3.1.1, S.46 und Kap. 3.1.2, S.48). Die Negativkontrolle enthielt ausschließlich H₂O. Es wurden keine RNS-Templates zugefügt.

Durch die Auswertung der Ct-Werte am LightCycler® (s. Abb. 3.5), konnte auf Primerdimerbildung geschlossen werden. Der Ct-Wert (12) von Mix 1 (RVFV, CCHFV, MARV) war deutlich niedriger als der Ct-Wert (20) von Mix 2 (EBOVZ, EBOVS, YFV, DENV) und Mix 3 (LASV) (26). Das lässt darauf schließen, dass es in Mix 1 zu mehr Primerdimerbildung kam als in den anderen Mischungen.

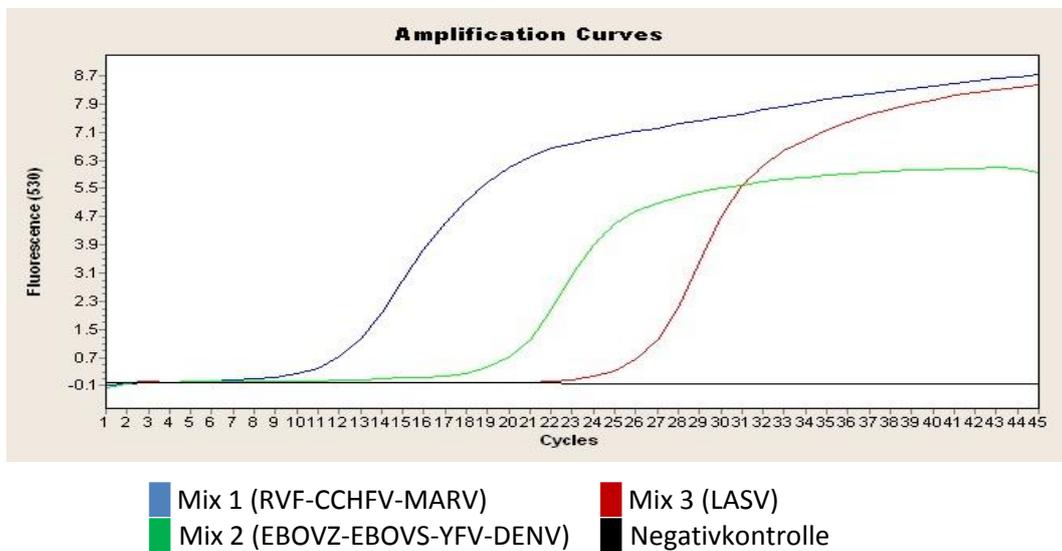


Abb. 3.5: **Bestimmung der Primerdimerbildung** einer SYBR-GREEN-qRT-PCR für Mix 1 (RVFV, CCHFV, MARV) und Mix 2 (EBOVZ, EBOVS, YFV) und Mix 3 (LASV). Die Primermischungen wurden mit einer Konzentration von 100 nM angesetzt. Es wurden keine RNS-Templates zugefügt.

3.1.4 Bestimmung des optimalen Primerverhältnisses

Wie die SYBR-Green-qRT-PCR zeigt (s. Kap. 3.1.1, S.46) waren in der symmetrischen Multiplex-PCR mit einer Primerkonzentration von 100nM am wenigsten Primerdimere aufgetreten. Deregt et al. (Deregt et al. 2006) und Horejsh et al. (Horejsh et al. 2005) beschrieben jedoch, dass bei Multiplex-RT-PCRs die Produkte einer asymmetrischen PCR im anschließenden CBA zu wesentlich höheren mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) führen als Produkte einer symmetrischen PCR.

Aus diesem Grund wurden alle Primermixe als asymmetrischen PCRs durchgeführt und im Agarosegel analysiert. Dabei wurden Multiplex-RT-PCRs für jeden Primermix in

asymmetrischen PCRs mit FP/RP-Verhältnissen von 1:4 und 4:1 (Primerkonzentration von 400nM: 100nM bzw. 100nM: 400nM) angesetzt und mit dem PCR-Programm aus Kap. 2.2.1.3.3 (S.35) amplifiziert. Als Template der entsprechenden Viren wurde 1µl des RNS-Standards in einer Konzentration von 10^6 Molekülen/µl verwendet. In der Gelelektrophorese wurden die Produkte auf 2%igem Agarosegel aufgetrennt und das effizientere Mischverhältnis zur Amplifikation der viralen RNS bestimmt.

Abb. 3.6 zeigt die Ergebnisse der Multiplex-RT-PCR auf dem Agarosegel von Primermix 1. Sowohl beim FP/RP-Verhältnis 1:4 als auch beim FP/RP-Verhältnis 4:1 ließen sich die Banden bei spezifischer Größe erkennen: RVFV 128 bp, CCHFV 172 bp und MARV 88 bp. Beim FP/RP-Verhältnis von 4:1 erscheinen die Banden in diesem Mix jedoch stärker. Aus diesem Grund wurde in der Multiplex-PCR für den CBA der vorliegenden Arbeit das 4:1-Primer-Verhältnis für Mix 1 angewendet.

Auch beim Primermix 2 (Abb. 3.7) traten die spezifischen Banden (EBOVZ 91 bp, EBOVS 89 bp, YFV 94 bp und DENV 87 bp) auf. Das FP/RP-Verhältnis 1:4 führt in diesem Primermix zu wesentlich deutlicheren Banden. Somit wurde für die Multiplex-PCR von Mix 2 das 1:4-Primer-Verhältnis ausgewählt.

Um die Multiplex-PCR für den Primermix 3 auszutesten wurde die RNS der LASV-Stämme AV und CSF vom Bernhard-Nocht-Institut verwendet. Dabei ließen sich nur im FP/RP-Verhältnis 1:4 die spezifischen Banden (LASV-AV 127 bp, LASV-CSF 136 bp) abbilden (s. Abb. 3.8), sodass die Multiplex-PCR von Mix 3 in der vorliegenden Arbeit mit einem 1:4-Primer-Verhältnis durchgeführt wurde.

Alle drei Primermischungen wiesen außer den Banden der spezifischen PCR-Amplifikate auch Banden unspezifischer Produkte (bei ca. 60-70bp) auf. Zur Entfernung dieser unspezifischen Produkte in Mix 1 wurde das MinElute-Purifikation-Kit von QIAGEN verwendet (Kap. 2.2.2.1, S.42).

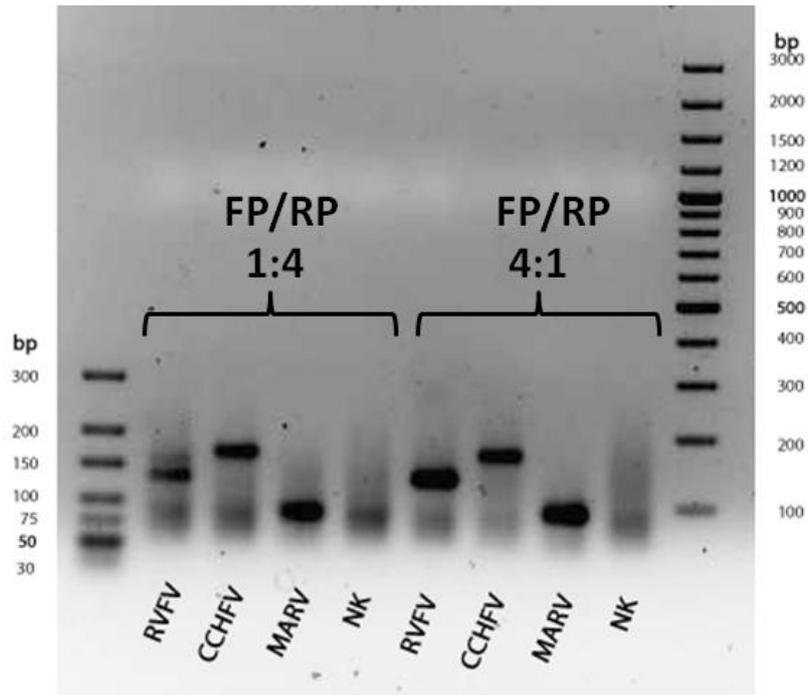


Abb. 3.6: Vergleich der asymmetrischen Multiplex-RT-PCR für Primermix 1 (RVFV, CCHFV, MARV), die asymmetrische Multiplex-RT-PCR mit einem FP/RP-Verhältnis von 4:1 erwies sich bei Primermix 1 als sensitiver. Es wurden pro Spur 10 μ l PCR-Probe bzw. 5 μ l DNA-Ladder (Größe 10-300 bp bzw. 100-3000 bp) auf 2%iges Agarosegel aufgetragen. Als Template der entsprechenden Viren wurde 1 μ l des RNS-Standards in einer Konzentration von 10^6 Molekülen/ μ l verwendet.

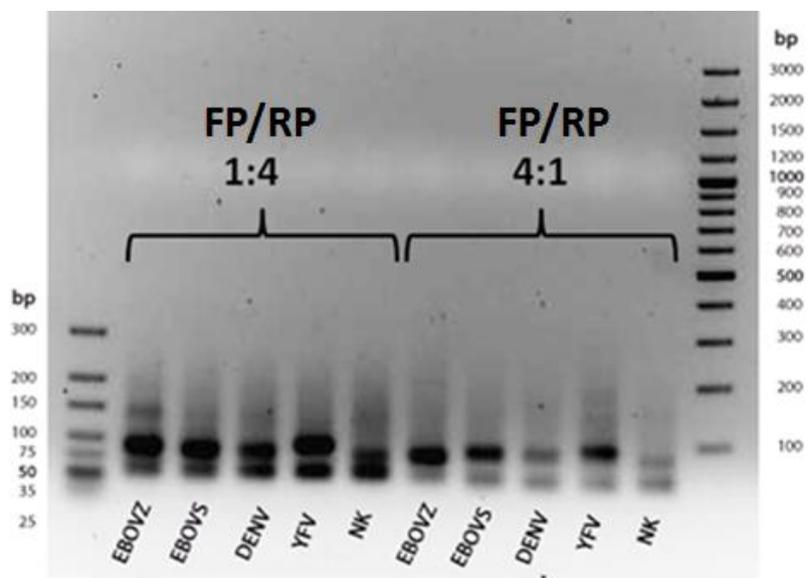


Abb. 3.7: Vergleich der asymmetrischen Multiplex-RT-PCR für Primermix 2 (EBOVZ, EBOVS, YFV), die asymmetrische Multiplex-RT-PCR mit einem FP/RP-Verhältnis von 1:4 erwies sich als sensitiver bei Primermix 2. Es wurden pro Spur 10 μ l PCR-Probe bzw. 5 μ l DNA-Ladder (Größe 10-300 bp bzw. 100-3000 bp) auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Als Template der entsprechenden Viren wurde 1 μ l des RNS-Standards in einer Konzentration von 10^6 Molekülen/ μ l verwendet.

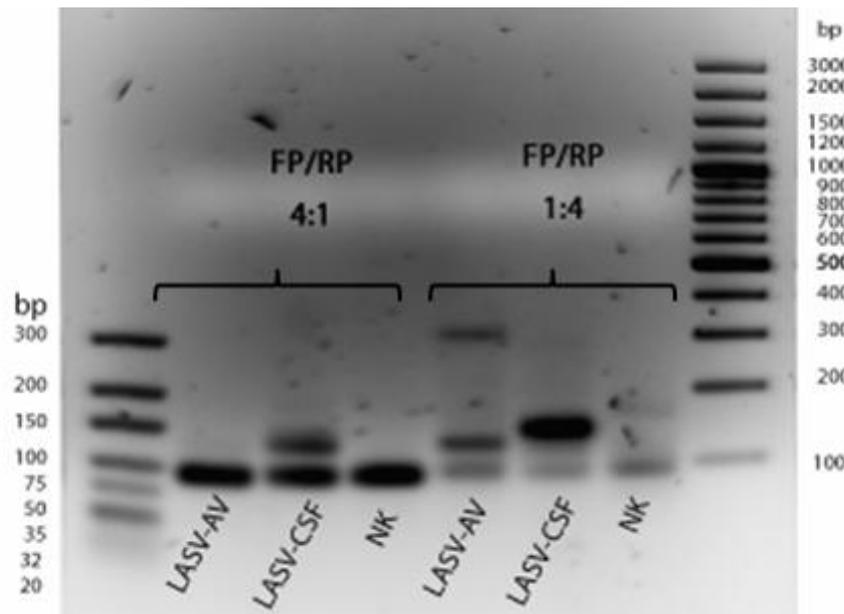


Abb. 3.8: **Vergleich der asymmetrischen Multiplex-RT-PCR für Primermix 3 (LASV)**, die asymmetrische Multiplex-RT-PCR mit einem FP/RP-Verhältnis von 1:4 erwies sich als sensitiver bei Primermix 3. In diesem FP/RP-Verhältnis trat zusätzlich in der LASV-AV-Probe eine unspezifische Bande bei 300bp auf. Es wurden pro Spur 10 μ l PCR-Probe bzw. 5 μ l DNA-Ladder (Größe 10-300 bp bzw. 100-3000 bp) auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Als Template der entsprechenden Viren wurde 1 μ l des RNS-Standards in einer Konzentration von 10^6 Molekülen/ μ l verwendet.

3.1.5 Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem MinElute-Purifikation-Kit

Zur Isolierung spezifischer PCR-Produkte wurden die PCR-Proben nach der Multiplex-RT-PCR mit dem MinElute-Purifikation-Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Durch den Reinigungsvorgang wurden alle Nukleinsäuren, die <70bp bzw. > 4kb waren und alle Proteine aus der Probe entfernt. Ergänzend zum Herstellerprotokoll wurde während der Reinigung mit dem MinElute-Purification-Kit vor dem Bindungsschritt ein zusätzlicher Waschschrift mit 750 μ l Guanidiniumhydrochlorid (35%) durchgeführt, um Primerdimere, die >20bp waren, effizienter zu entfernen (s.Kap. 2.2.2.1, S.42).

Es zeigte sich, dass eine erfolgreiche Hybridisierung der PCR-Produkte aus Mix 1 an die bead-gekoppelten Oligonukleotidsonden erst nach der Aufreinigung mit dem MinElute-Purifikation-Kit möglich war. Bei Mix 2 und Mix 3 ließ sich bei der Hybridisierungsreaktion kein Unterschied zu den unbereinigten PCR-Produkten erkennen. Deshalb wurde die Aufreinigung durch das MinElute-Purification-Kit in der vorliegenden Arbeit nur für Mix 1 durchgeführt.

In Abb. 3.9 wird der Vergleich der PCR-Produkte mit und ohne Aufreinigung durch das MinElute-Purifikation-Kit dargestellt. Dabei zeigt sich deutlich, dass durch die

Aufreinigung alle unspezifischen PCR-Produkte entfernt werden konnten. Bei den Proben, die über MinElute-Purifikation aufgereinigt wurden, lassen sich lediglich die spezifischen Banden der spezifischen Produkte erkennen, allerdings in geringerer Konzentration.

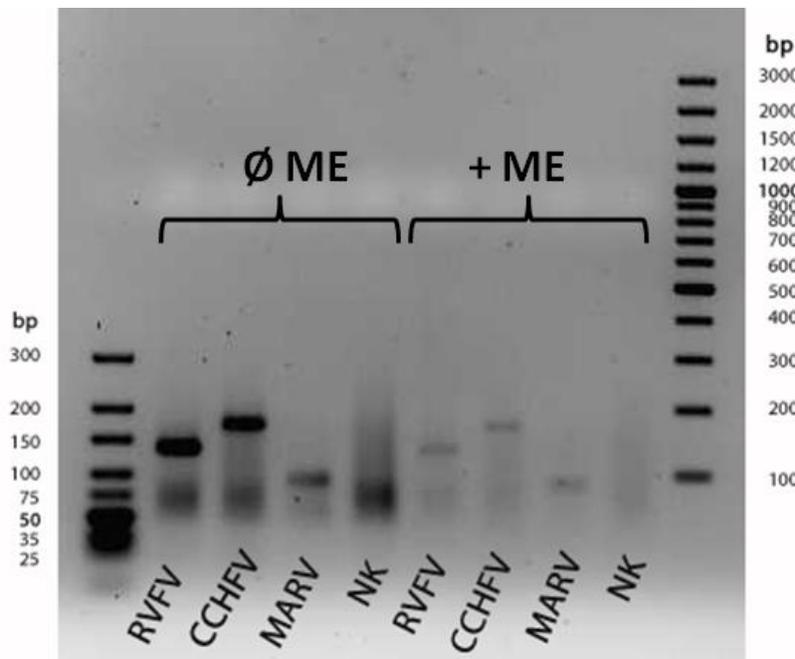


Abb. 3.9: **Vergleich der PCR-Produkte für Primermix 1 mit und ohne Aufreinigung mit MinElute-Purifikation-Kit**, in den Proben, die mit MinElute-Purifikation gereinigt wurden, lassen sich nur noch die Banden der spezifischen PCR-Produkte erkennen, es wurden pro Spur 10 μ l PCR-Probe bzw. 5 μ l DNA-Ladder (Größe 10-300 bp bzw. 100-3000 bp) auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

3.2 Kopplung der Sonde an Beads

Um die biotinylierten PCR-Produkte an die Beads binden zu können, mussten zuvor aminierte Oligonukleotidsonden an die carboxylierten Kugeln gekoppelt werden. Durch Hybridisierung an diese immobilisierten Oligonukleotidsonden wurde anschließend die Bindung der PCR-Produkte an die Beads ermöglicht.

Die Kopplungsreaktion erfolgte über eine Carbodiimid-Reaktion, in der die funktionellen Carbonsäuregruppen der Beads durch den Kreuzvernetzer EDAC aktiviert wurden und daraufhin eine kovalente Bindung mit den freien Aminogruppen der aminierten DNS-Sonden eingingen (s. Kap.2.2.2.2, S.43).

Für sechs der zu untersuchenden HFV (RVFV, CCHFV, MARV, EBOVZ, EBOVS, DENV) wurde die Sequenz der TaqMan-Sonden synthetisiert und als Sonde an die Beads

gekoppelt (Länge 25-35nt). Bei YFV und LASV wurden kurze *locked-nucleic-acid* (LNA)-Sonde synthetisiert, die aufgrund ihrer LNA-Basen eine erhöhte T_M besitzen (Länge 4-22nt) (Weidmann et al. 2010).

Die Sonden der einzelnen HFV-Nachweise wurden an verschiedene BPs mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der Fluoreszenzfarbstoffen (APC, APC-Cy7) gekoppelt um die einzelnen Populationen und die daran gekoppelten Sonden im Durchflusszytometer voneinander zu unterscheiden. Für die Kopplungsreaktion von $1,25 \times 10^6$ Beads (s. Kap.2.2.2.2, S.43) wurde eine Sondenmenge von je 400 pmol eingesetzt. Dabei wurden die einzelnen BPs so aufeinander abgestimmt, dass sich die Emissionspektren ihrer Fluoreszenzfarbstoffe (APC, APC-Cy7) in den drei Mixen nicht überschneiden. Insgesamt wurden 13 verschiedene Oligonukleotidsonden synthetisiert.

Tab. 3.1: Eingesetzte Oligonukleotidsonden und zugehörige Beadpopulationen

	Name der Sonde	BP	Name der Sonde	BP	Name der Sonde	BP		
MIX 1	RVFV	Nr. 1	MIX 2	EBOVZ	Nr. 8	MIX 3	LASV-LNA 1	Nr. 3
	CCSMW-TM	Nr. 6		EBOVS	Nr. 23		LASV-LNA 2	Nr. 15
	MARV	Nr. 36		YFV	Nr.50		LASV-LNA 3	Nr. 29
		DENV		Nr. 44	LASV-LNA 4		Nr. 32	
					LASV-LNA 5		Nr. 40	
Kontrolle	CCHF-Cy3	Nr.17						

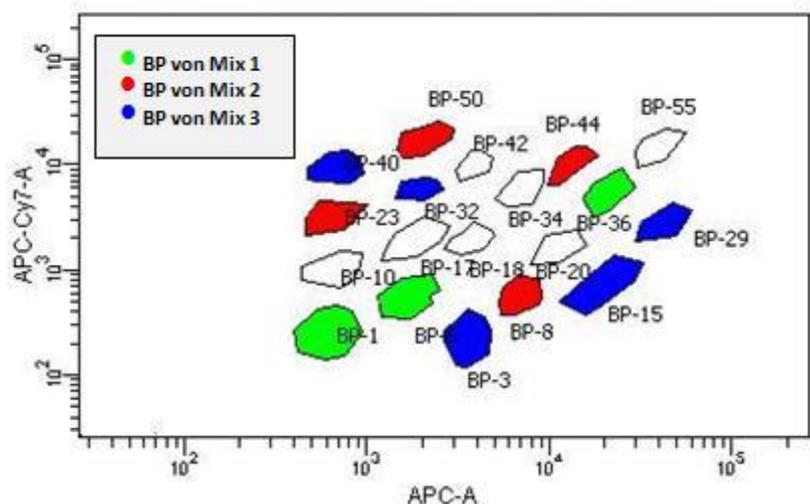


Abb. 3.10: Darstellung eines Dot-Plot-Diagramms, in dem die Verteilung der Beadpopulationen (BP) von Mix 1, 2, und 3 abhängig vom internen Mischverhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe APC und APC-Cy7 abgebildet wird. Die BPs wurden für jeden Mix so aufeinander abgestimmt, dass Überschneidungen bei den Emissionsmaxima der Farbstoffe APC und APC-Cy7 vermieden wurden.

Zur Überprüfung der Kopplung wurde in einem Parallelansatz eine CCHFV-Oligonukleotidsonde eingesetzt, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert war. Durch wiederholtes Mitführen dieser Kontrolle mit Cy3-markierter Sonde bei den Versuchen konnte die Effizienz der Kopplungen überwacht und miteinander verglichen werden (s. Kap 3.2.1, S.59).

Nach der Kopplung erfolgte die Analyse der Fluoreszenzintensität des Cy3-Fluoreszenzfarbstoffes am Durchflusszytometer. Das Emissionsmaximum dieses Fluoreszenzfarbstoffes (Cy3) liegt mit 575 nm dicht am Emissionsmaximum von PE (Phycoerythrin), das bei 585 nm emittiert und konnte deswegen im PE-Fluoreszenzkanal des FACS Canto™ II detektiert und mit der FACS-Diva-Software analysiert werden.

Für die Kopplungskontrolle wurden in einem ersten Experiment 400 pmol der Cy3-markierten CCHFV-Sonde an $1,25 \times 10^6$ Beads der BP Nr. 17 mithilfe von EDAC gekoppelt (s. Kap.2.2.2.2, S.43) und im Anschluss an die Kopplung im FACS analysiert. Zum Vergleich wurde eine Negativprobe mitgeführt, die Beads derselben Population (BP Nr.17) und, anstelle der Cy3-markierten Sonde, H₂O enthielt. Die Probe mit der Cy3-markierten Sonde wies ein deutlich höheres Fluoreszenzsignal im PE-Kanal (MFI-PE: 27.437) auf als die Negativkontrollprobe (MFI-PE: 331). Dieses Ergebnis (MFI-PE 82,9x höher als NK) beweist eine erfolgreiche Kopplung der Oligonukleotidsonde an die Beads.

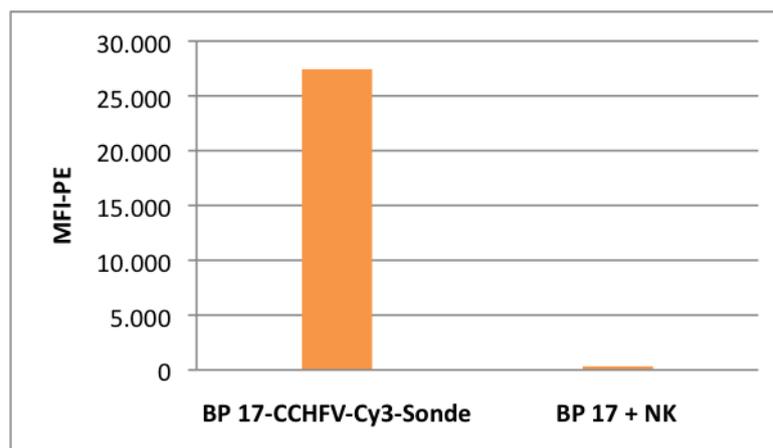


Abb. 3.11: **Qualitative Kontrolle der Kopplung mit einer Cy3-markierten CCHFV-Sonde:** Vergleich der Fluoreszenzsignale der an die BP Nr. 17 gekoppelten Cy3-markierten Sonde (MFI-PE: 27.437) mit der Negativkontrolle (MFI-PE:331).

3.2.1 Reproduzierbarkeit der Kopplung

Um die Reliabilität und Reproduzierbarkeit der Kopplung zu überprüfen, wurde zu jeder Versuchsreihe eine Kopplungskontrolle parallel mit einer Cy3-markierten Sonde durchgeführt. Eine direkte Kontrolle der Kopplungsreaktion der Oligonukleotidsonde an die carboxylierten Kugeln war nicht möglich (s. Kap 3.2).

Der Mittelwert der Fluoreszenzsignale der Cy3-markierten Sonden lag bei MFI-PE: 27.502 ± 3762 (s. Abb. 3.2 Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden..). Der Maximalwert (MFI-PE: 39.480) wurde bei der Kopplungskontrolle vom 17.06.09 ermittelt. Durch die mehrfache Überprüfung der Kopplung konnte ein hoher Grad an Reproduzierbarkeit für die Kopplungsreaktion nachgewiesen werden.

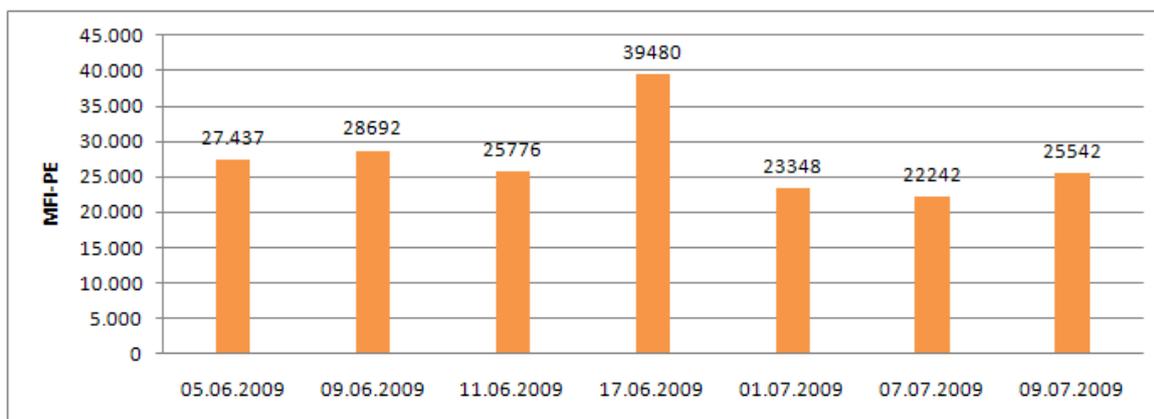


Abb. 3.12: Effizienzkontrolle der Kopplung mit einer Cy3-markierten CCFHV-Sonde, ein Vergleich der MFI-PE-Signale der fluoreszenzmarkierten Cy3-Sonde von verschiedenen Versuchsreihen

3.3 Hybridisierung an bead-gekoppelte Sonden und Detektion

Im Anschluss an die erfolgreiche kovalente Kopplung der Oligonukleotidsonden an die Beads konnten die PCR-Amplifikate an die gekoppelten Oligonukleotidsonden hybridisiert werden.

Für diese Hybridisierungsreaktionen wurden je 5 μ l der PCR-Amplifikate (1:2 mit Tris-EDTA, pH 8,0, verdünnt) bei 96°C für 5 min denaturiert und danach sofort auf Eis gekühlt um eine Renaturierung zu verhindern. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss für eine Stunde bei 60°C mit 5 μ l der gekoppelten Beads inkubiert. Der qualitative Nachweis der Hybridisierung erfolgte durch die Bindung von 10 μ g/ml SARPE (Streptavidin-R-Phycoerythrin) an die biotinylierten PCR-Produkte. Individuelle Proben

wurden zuerst im Uniplex-Hybridisierungsverfahren untersucht (s. Kap. 3.3.2, S.63). Dann erfolgte die Analyse der einzelnen Mixe (Mix 1-3) im Multiplex-Hybridisierungsverfahren (s. Kap. 3.3.3, S.65).

Die Sensitivität des CBAs wurde im Uniplex- und Multiplex-Hybridisierungsverfahren ermittelt und miteinander verglichen (s. Kap. 3.3.4, S.70 und Kap. 3.3.5, S.73). Im Anschluss erfolgte eine statistische Analyse der Ergebnisse und die Entwicklung einer Methode zur Grenzwertbestimmung (s. Kap. 3.3.6, S.76). Um die Spezifität zu überprüfen wurden die Mixe 1, 2, 3 schließlich auf Kreuzreaktivität getestet (s. Kap. 3.3.7, S.80).

3.3.1 Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

Zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der Hybridisierungsreaktion wurden während der experimentellen Versuchsreihen verschiedene Parameter optimiert: die Hybridisierungstemperatur (s. Kap. 3.3.1.1), die Lagerungstemperatur, die Lagerungsdauer (s. Kap. 3.3.1.2, S.61) und die Hybridisierungspuffer (s. Kap. 3.3.1.3, S.62).

3.3.1.1 Optimierung der Hybridisierungstemperatur

Um die PCR-Amplifikate an die Oligonukleotidsonden hybridisieren zu können, musste die optimale Hybridisierungstemperatur gewählt werden. Da die Hybridisierung im Multiplex-System aus Mischungen mit bis zu vier BPs erfolgen sollte, musste die Hybridisierungstemperatur den Bedingungen aller beteiligten Oligonukleotide entsprechen. Auf Zusätze wie apolares Formamid 20% oder DMSO sollte in dem Multiplex-System verzichtet werden. Eine Zugabe weiterer Substanzen hätte das komplexe Multiplex-System komplizierter gemacht und damit die Überführung in die Routinediagnostik erschwert.

Bei der Betrachtung der Schmelztemperaturen der Oligonukleotidsonden (s. Tab. 2.8, S.29) wurde deutlich, dass Temperaturen $>61^{\circ}\text{C}$ die Hybridisierung der spezifischen PCR-Amplifikate an die Sonden verhinderten. Dem gegenüber bestand die Gefahr, dass Temperaturen $<60^{\circ}\text{C}$ die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Hybridisierungen erhöhen.

Folgende Hybridisierungstemperaturen wurden getestet: 55°C, 57°C, 60°C, 65°C. Bei einer Temperatur von 60°C wurde eine optimale Hybridisierung der PCR-Produkte aller Viren an die Sonden erzielt, die ausreichend hohe MFI-PE-Werte erreicht und unspezifische Bindungen durch Hybridisierung minimiert.

3.3.1.2 Bedeutung der Lagerungsbedingungen der Beads für die Hybridisierung

Um den Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Sensitivität des CBAs zu bestimmen, wurden PCR-Produkte von DENV in unterschiedlichen Konzentrationen (10^7 - 10^1 Moleküle/ μ l) an Beads hybridisiert, die unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert wurden: eine Versuchsreihe wurde nach der Kopplung mit Oligonukleotidsonden über Nacht bei -20°C gelagert und erst am folgenden Tag fand die Hybridisierung an die PCR-Amplifikate statt. Eine weitere Versuchsreihe wurde direkt im Anschluss an die Kopplung zur Hybridisierung weiterverwendet.

Die erzielten Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Ansätze wurden am FACS Canto™ II verglichen. Im Liniendiagramm (s. Abb. 3.13.) in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** sind die MFI-PE-Werte dargestellt. Es wird deutlich, dass die Fluoreszenzintensitäten bei Lagerung der gekoppelten Beads über Nacht bei -20°C (MFI-PE: 50913) im Vergleich zu Proben, die direkt nach der Kopplung zur Hybridisierung verwendet wurden (MFI-PE: 14654), auf das 3,5-Fache erhöht ist.

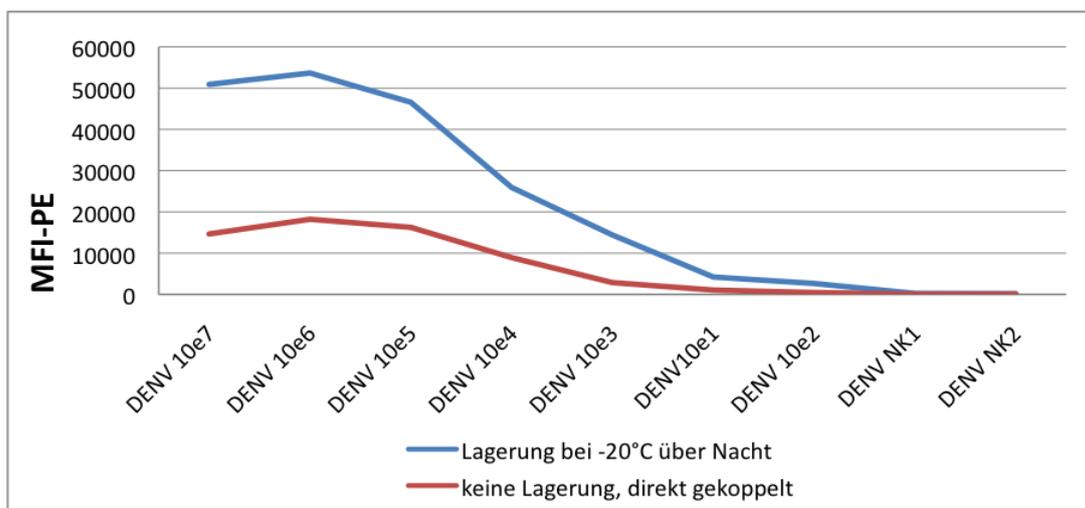


Abb.3.13: **Uniplex-Sensitivitätsmessung von DENV bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen:** Bei Sensitivitätsmessung 1 (blau) wurden die Beads über Nacht bei -20°C nach der Kopplungsreaktion gelagert, bei Sensitivitätsmessung 2 (rot) wurden die Beads direkt im Anschluss an die Kopplung zur Hybridisierung verwendet.

3.3.1.3 Notwendigkeit des BSA-Puffers

Um unspezifische MFI-PE-Signale bei der Hybridisierungsreaktion zu vermeiden, mussten die freien Carboxylgruppen der Beads abgesättigt sein. Da durch die Oligonukleotidsonden in dem vorausgehenden Kopplungsschritt die Carboxylgruppen der Beads nicht vollständig besetzt wurden, war es nötig diese freien, zum Teil noch durch das EDAC aktivierten COOH-Gruppen durch die Zugabe eines Blockierungspuffers abzusättigen, damit diese COOH-Gruppen nicht unspezifisch mit dem Reporter Streptavidin-Phycoerythrin reagierten. Bovines Serumalbumin (BSA) und Difco™ Skim Milk (SM) sind Blockpuffer, die mit ihren Amin-Gruppen kovalente Peptidbindungen mit Carboxylgruppen ausbilden können und somit eine stabilisierende Wirkung erzielen. Es wurden zwei verschiedenen Blockpuffer getestet: 10% BSA (in 0,02% Tween) und 10% SM (in 0,02% Tween). Die Beads wurden ohne gekoppelte Sonden nach der Methode, die in Kap. 2.2.2.2 (S.43) beschrieben ist, bei 60°C erhitzt und in 100 µl SARPE, das zuvor in 0,02% Tween 20 in FACS-Flow (10 µg/ml) verdünnt wurde, inkubiert. Statt der PCR-Amplifikate wurden 5µl H₂O hinzugegeben. Insgesamt wurden in drei Durchläufen jeweils zwei Proben angesetzt: 1) Beadpopulation (BP) mit H₂O und 50µl 10% BSA (in Tween 20) und 2) BP mit H₂O und 50µl 10% SM (in Tween 20). Als Vergleich diente 3) die Negativkontrolle mit BP und H₂O anstelle von Blockpuffer.

Die Ansätze, die einen Blockpuffer (BSA oder SM) enthielten, zeigten nur schwache Fluoreszenzsignale (Abb. 3.14). Bei der Kontrollprobe ohne Blockpuffer hingegen wurde im Vergleich zu der Probe mit BP+H₂O+BSA ein 49,11-fach stärkeres und im Vergleich zu den Proben mit BP+H₂O+SM ein 62,08-fach stärkeres MFI-PE-Signal gemessen. Somit konnte demonstriert werden, dass durch die Zugabe von Blockpuffer hohe Fluoreszenzsignale durch unspezifische Bindungen des SARPE an die Beads verhindert werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Blockierung der freien Carboxylgruppen der BSA-Puffer ausgewählt, da SM als Proteingemisch in verschiedenen Produktionsreihen starke Variationen in seiner Zusammensetzung aufweist, während BSA nur reines bovines Serum enthält.

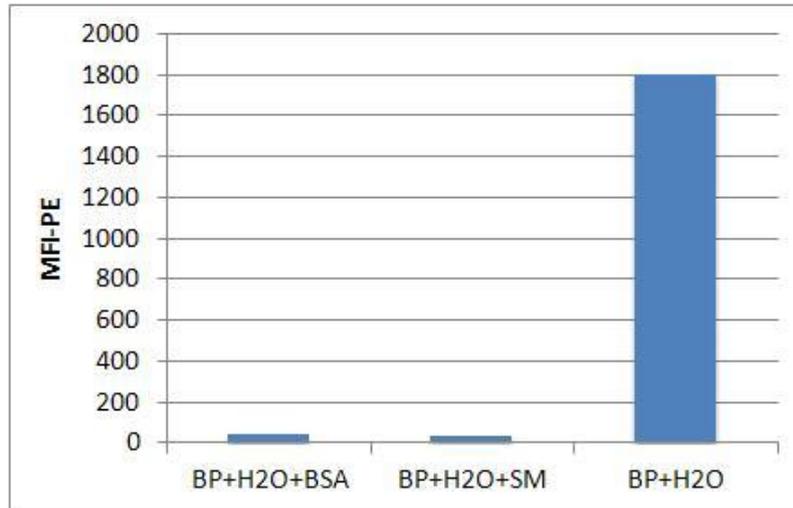


Abb. 3.14: **Notwendigkeit des Blockpuffers.** Pro Probe wurden 1000 Beads im FACS Canto™II analysiert, jede Probe enthielt jeweils 5µl ungekoppelte Beads (1:2 mit Tris-EDTA, pH 8,0, verdünnt) mit 5µl H₂O und 50µl Blockpuffer (Bovines Serumalbumin, BSA/ Difco™ SkimMilk, SM), die Negativkontrolle enthielt lediglich 5µl ungekoppelte Beads und 5µl H₂O (n=3). Die Messung erfolgte nach Inkubation in 100 µl SARPE, das zuvor in 0,02% Tween 20 in FACS-Flow (10 µg/ml) verdünnt wurde

3.3.2 Qualitativer Beweis im Uniplex-Hybridisierungsverfahren

Für den qualitativen Nachweis des Hybridisierungsverfahrens wurden die biotinylierten PCR-Amplifikate im Uniplex-System an Beads hybridisiert.

Für jedes Virus wurden drei Ansätze zusammengestellt: (1) eine Probe mit einem PCR-Amplifikat der spezifischen Virus-RNS, (2) eine Probe mit einem PCR-Amplifikat einer unspezifischen Virus-RNS und (3) die Negativkontrolle (NK) mit negativem Humanserum. Die Ansätze wurden, wie in Kap. 2.2.2.3 (S.44) beschrieben, bei 60°C für eine Stunde hybridisiert. Im Anschluss wurden die Ansätze mit einem SARPE inkubiert und am FACS Canto™ II gemessen. Es wurden jeweils 1000 Beads pro Probe gezählt und ausgewertet.

Abb. 3.15 zeigt ein Säulendiagramm der MFI-PE für die Proben von sieben HFV aus Mix 1 und Mix 2. Für Mix 3 wäre eine Hybridisierung im Uniplex-System nur wenig aussagekräftig gewesen, da das LASV aufgrund seiner genetischen Variabilität nur im Multiplex-System zuverlässig nachgewiesen werden kann. Aus diesem Grund wurde auf eine Uniplex-Hybridisierung in Mix 3 verzichtet. Der Ansatz mit der spezifischen Virus-RNS erzielte jeweils eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität als die Negativkontrollen und die Ansätze mit der unspezifischen viralen RNS. Da die absoluten MFI-PE-Werte der

Viren sich im Intra-Assay-Vergleich stark unterschieden, konnte eine Aussage nur in Relation zur NK getroffen werden.

Die Ansätze für RVFV, CCHFV, MARV, erreichten eine respektive MFI-PE von 7.428, 768, 5.519 in der hybridisierten Probe, dh. die spezifische Probe erreichte 30,2-fach (RVFV), 13,3-fach (CCHFV) und 20,4-fach (MARV) höhere Werte als die Kontrollprobe.

Für die Viren aus Mix 2 ergaben sich ebenfalls wesentlich höhere MFI-PE in den spezifischen Proben als in der NK: EBOVZ-MFI-PE: 1.403 (9,5-fach), EBOVS-MFI-PE: 1.484 (6,3-fach), YFV-MFI-PE: 3.388 (33,5-fach) und DENV-MFI-PE: 5.569 (43,9-fach).

Für die Uniplex-Hybridisierungen mit unspezifischen Viren wurde jeweils die Ziel-RNS eines anderen Virus, der zum selben Mix wie das spezifische Virus gehörte, verwendet. Es traten keine Hinweise auf Kreuzreaktionen auf. Die Fluoreszenzintensitäten der unspezifischen viralen RNS glichen den Fluoreszenzintensitäten der NK. Damit ist ein erfolgreicher Nachweis der spezifischen Uniplex-Hybridisierung gelungen.

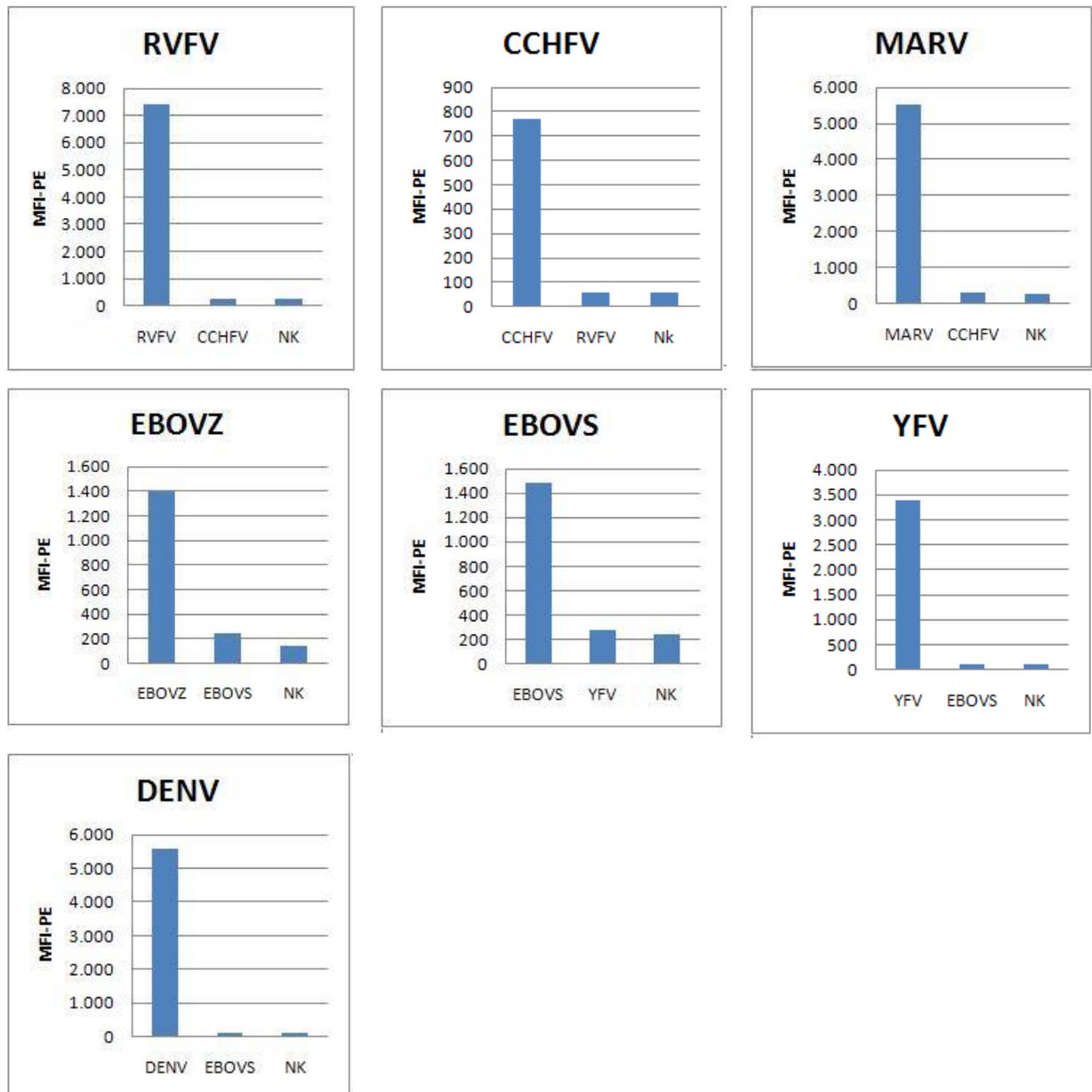


Abb. 3.15: **Uniplex-Hybridisierungsverfahren.** Pro Virus wurden drei Ansätze getestet: (1) Probe mit PCR-Amplifikaten der spezifischen Virus-RNS, (2) Probe mit PCR-Amplifikaten einer unspezifischen Virus-RNS, (3) NK mit negativem Humanserum. Nach Inkubation mit dem Reporter-Farbstoff-Konjugat SARPE konnte eine spezifische Hybridisierung an die Beads detektiert werden. Pro Ansatz wurden 1000 Beads zytometrisch gemessen.

3.3.3 Qualitativer Beweis im Multiplex-Hybridisierungsverfahren

Nachdem der CBA für die sieben HFV erfolgreich im Uniplex-Hybridisierungsverfahren angewendet wurde, sollte das Multiplex-Hybridisierungsverfahren zur simultanen Analyse mehrerer BPs und der daran hybridisierten PCR-Amplifikate in einem Ansatz getestet werden. Die Zusammenstellung der drei Multiplex-Mixe wurden durch qRT-PCR

aufeinander abgestimmt und auf Dimerbildung untersucht (s. Kap 3.1.2, S.48). Die Kopplung der spezifischen Oligonukleotidsonden an unterschiedliche BPs wurde für die drei Multiplex-Mixe abhängig von den Emissionsmaxima der unterschiedlichen BPs bestimmt und nach dem Protokoll aus Kap. 3.2. (S. 56) durchgeführt.

Jeder Ansatz des Multiplex-Systems enthielt je 5µl aller BPs des jeweiligen Mixes, die an spezifische Oligonukleotidsonden gekoppelt waren, und wurde mit je 5µl eines biotinylierten PCR-Amplifikats aus dem Spektrum des entsprechenden Multiplex-Mixes (1:2 mit Tris-EDTA, pH 8,0, verdünnt) getestet. Als NK wurde, wie im Uniplex-System, negatives Humanserum anstelle der PCR-Amplifikate verwendet.

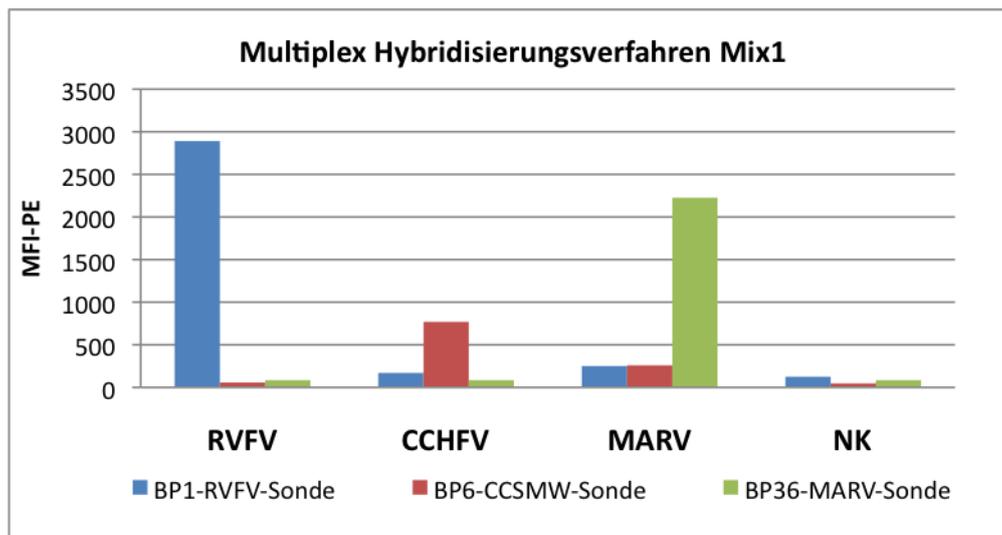
Die Hybridisierung erfolgte nach der gleichen Methode wie im Uniplex-Hybridisierungsverfahren bei 60°C und nachfolgender Inkubation mit SARPE (s. Kap 3.3.2, S.63).

Die Ergebnisse der Auswertung am FACS Canto™ II wurden in Abb. 3.16 und Abb.3.17 dargestellt. Da Mix 1 aus drei verschiedene BP für drei Viren (RVFV, CCHFV, MARV) bestand, wurden insgesamt 3000 Beads ausgewertet (1000 Beads/Population). In Abb. 3.16 waren die wesentlich höheren Fluoreszenzsignale der spezifischen Sonden offensichtlich. Bei der Analyse wurden die Ergebnisse der spezifischen Sonden im Verhältnis zum Mittelwert der Negativkontrollen (MFI-PE: 85,2) gesetzt. So ergeben sich für RVFV 33,9-fach, für CCHFV 9-fach und für MARV 26,1-fach höhere Fluoreszenzen als für die negativen Kontrollproben. Die unspezifischen Sonden erreichten MFI-PE-Werte, die wesentlich niedriger waren und nicht über den 3-fachen Wert der Negativkontrollen reichten.

Da Mix 2 aus vier verschiedenen BPs für vier Viren (EBOVZ, EBOVS, YFV, DENV) bestand, wurden insgesamt 4000 Beads am FACS Canto™ II ausgewertet. Bei dem Multiplex-Hybridisierungsverfahren von Mix 2 wurde ein Mittelwert für die MFI-PE der Negativkontrollen von 136 ermittelt. Die spezifischen Sonden zeigten auch in diesem Mix vergleichsweise hohe Fluoreszenzen: EBOVZ 54,7-fach, EBOVS 22,5-fach, YFV 13-fach und DENV 29,8-fach erhöhte MFI-PE. Die erzielten Fluoreszenzwerte der unspezifischen Sonden erreichten maximal eine 1,8-fache MFI-PE im Vergleich zu den negativen Kontrollproben.

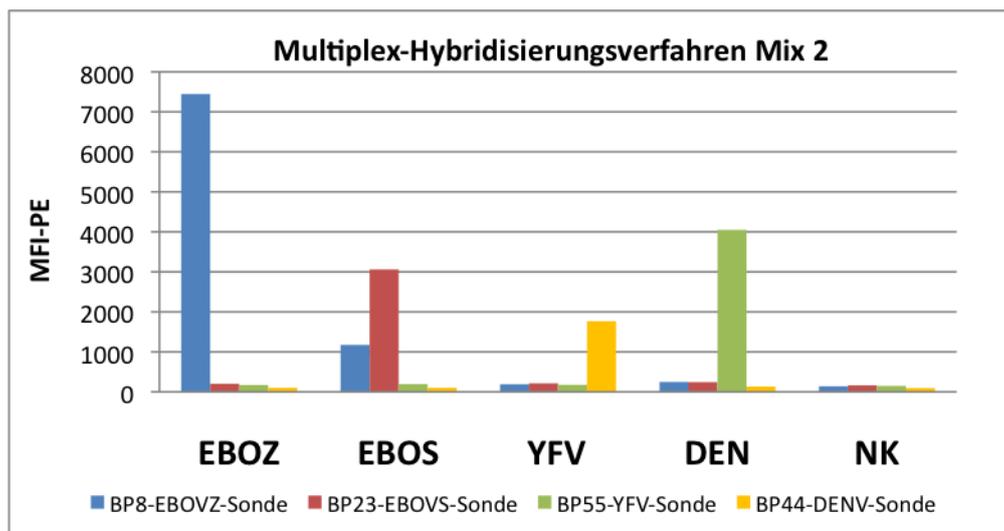
Diese Ergebnisse zeigten, dass die Hybridisierungsreaktion zusätzlich zum Uniplex-System (s. Kap. 3.3.2, S.63) auch im Multiplex-System erfolgreich umgesetzt werden konnte.

Auffällig war, dass BP8-EBOVZ im Ansatz mit dem EBOVS-Amplifikat eine 8,6-fach MFI-PE im Vergleich zur NK erreichte. Dies ließ auf eine eventuelle Kreuzreaktion zwischen der EBOVZ-Sonde und dem RNS-Standard von EBOVS schließen.



MFI-PE	RVFV	CCHFV	MARV	NK
BP1-RVFV-Sonde	2892	170	250	125
BP6-CCSMW-Sonde	58	769	259	47
BP36-MARV-Sonde	84	84	2226	84

Abb. 3.16: **Multiplex-Hybridisierungsverfahren mit den BPs von Mix 1.** Pro Probe wurden 3000 Beads zytometrisch gemessen, jede Probe enthielt jeweils 5µl gekoppelte Beads von BP1-RVFV-Sonde, BP6-CCSMW-TM-Sonde und BP36-MARV-Sonde) und je ein biotinyliertes PCR-Amplifikat aus der Multiplex-RT-PCR von Mix 1 (RVFV 10⁶ Kopien/µl, CCHF 10⁶ Kopien/µl, MARV 10⁶ Kopien/µl).



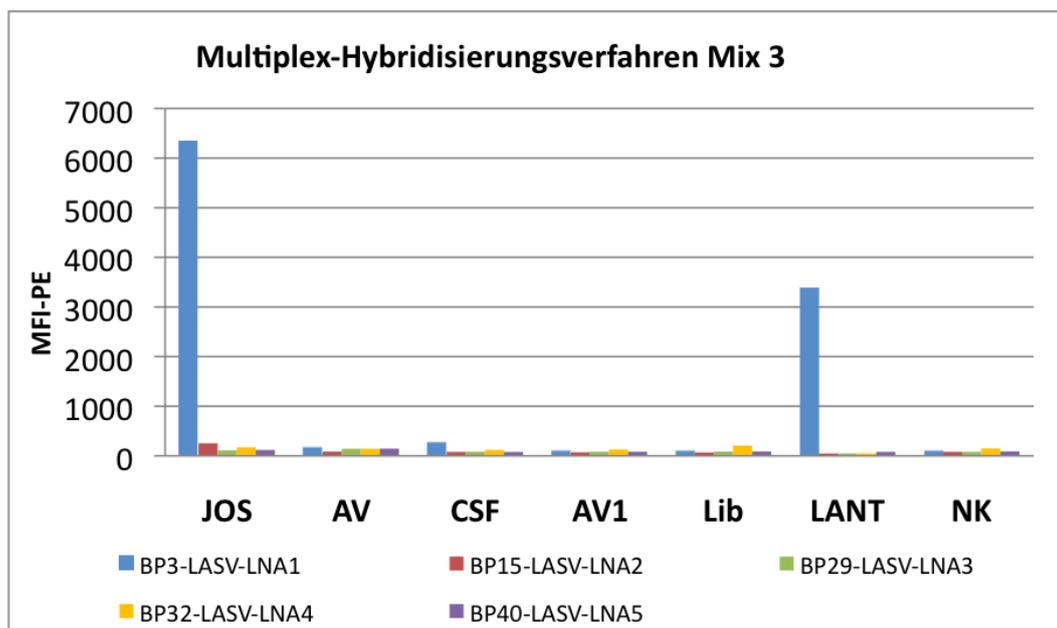
MFI-PE	EBOVZ	EBOVS	YFV	DENV	NK
BP8-EBOVZ-Sonde	7444	1174	189	248	141
BP23-EBOVS-Sonde	203	3061	213	244	161
BP44-DENV-Sonde	171	194	176	4049	149
BP50-YFV-Sonde	103	103	1766	133	95

Abb.3.17: **Multiplex-Hybridisierungsverfahren mit den BPs von Mix 2.** Pro Probe wurden 4000 Beads zytometrisch gemessen, jede Probe enthielt jeweils 5 µl gekoppelte Beads von BP6-EBOVZ, BP23-EBOVS, BP44-DENV und BP50-YFV und 5µl eines biotinylierten PCR-Amplifikates aus der Multiplex-RT-PCR von Mix 2 (EBOVZ 10⁶ Kopien/µl, EBOVS 10⁶ Kopien/µl, YFV 10⁶ Kopien/µl, DENV 10⁶ Kopien/µl).

Im Mix 3 sollte das LASV im CBA detektiert werden. Aufgrund der genetischen Variabilität dieses Virus wurden fünf verschiedene Oligonukleotidsonden in einem Multiplex-Hybridisierungsverfahren kombiniert, um das gesamte Spektrum der Variabilität der LASV-Stämme erfassen zu können. Aus diesem Grund wurde auch kein Uniplex-Hybridisierungsverfahren für LASV durchgeführt (s. Kap. 3.3.2, S.63). Hybridisierungsversuche mit den einzelnen LASV-Sonden hätten nur geringe Aussagekraft gehabt.

Repräsentativ für die Variationsbreite der LASV wurden die fünf LASV-LNA-Sonden in Multiplex-Hybridisierungen mit der genomischen RNS der LASV-Stämme LASV JOS, LASV LANT, LASV AV, LASV CSF getestet. Bei der Detektion am FACS Canto™ II wurden jeweils 4000 Beads pro Probe ausgewertet.

Abb.3.18 zeigt ein Säulendiagramm mit den Ergebnissen dieses Multiplex-Hybridisierungslaufes von Mix 3. Wie erwartet weist LASV-LNA-Sonde1 bei Zugabe von LASV-JOS sehr hohe MFI-PE (62-fache MFI-PE der NK: 101,8) auf. Die Sonde ist zur spezifischen Detektion der Sequenz des L-Segmentes des Josiah-Virus entwickelt worden. Die gleiche Sonde zeigt auch bei LASV-LANT ähnlich hohe MFI-PE-Signale (33-fach). Die Fluoreszenzsignale der übrigen LASV-Sonden sind vergleichsweise schwach (MFI-PE: 112-254). Obwohl sich die Zielregionen der LASV-LNA-Sonde5 auf dem L-Segment des Lassa AV-Stammes befand, lassen sich nur schwache Fluoreszenzsignale in den Proben mit AV und AV1 messen, die vergleichbar mit den MFI-PE der Negativkontrolle (MFI-PE: 80-112) waren. Die LASV-LNA-Sonde2, die zur Detektion des L-Segmentes des CSF-Stammes synthetisiert worden ist, zeige ebenfalls schwache Emission (MFI-PE:79) bei der Zugabe von CSF. Auf der anderen Seite ist die Fluoreszenz der LASV-LNA-Sonde1 bei CSF dezent erhöht (MFI-PE: 280).



MFI-PE	JOS	AV	CSF	AV1	Lib	LANT	NK
BP3-LNA1-Sonde	6319	180	280	114	112	3377	112
BP15-LNA2-Sonde	254	85	79	71	68	47	80
BP29-LNA3-Sonde	112	143	83	83	86	49	80
BP32-LNA4-Sonde	171	143	119	128	206	49	148
BP40-LNA5-Sonde	119	145	78	82	88	79	89

Abb.3.18: **Multiplex-Hybridisierungsverfahren mit den BPs von Mix 3.** Pro Probe wurden 4000 Beads zytometrisch gemessen, jede Probe enthielt jeweils 5µl gekoppelte Beads der 5 LASV-LNA-Sonden (BP3-LASV-LNA1, BP15-LASV-LNA2, BP29-LASV-LNA3, LASV-LNA4, BP40-LASV-LNA5) und ein 5 µl PCR-Amplifikat aus Multiplex-RT-PCRs (1:2 mit Tris-EDTA, pH 8,0, verdünnt) mit verschiedenen LASV-Proben (JOS, AV, CSF, AV1, Lib, LANT).

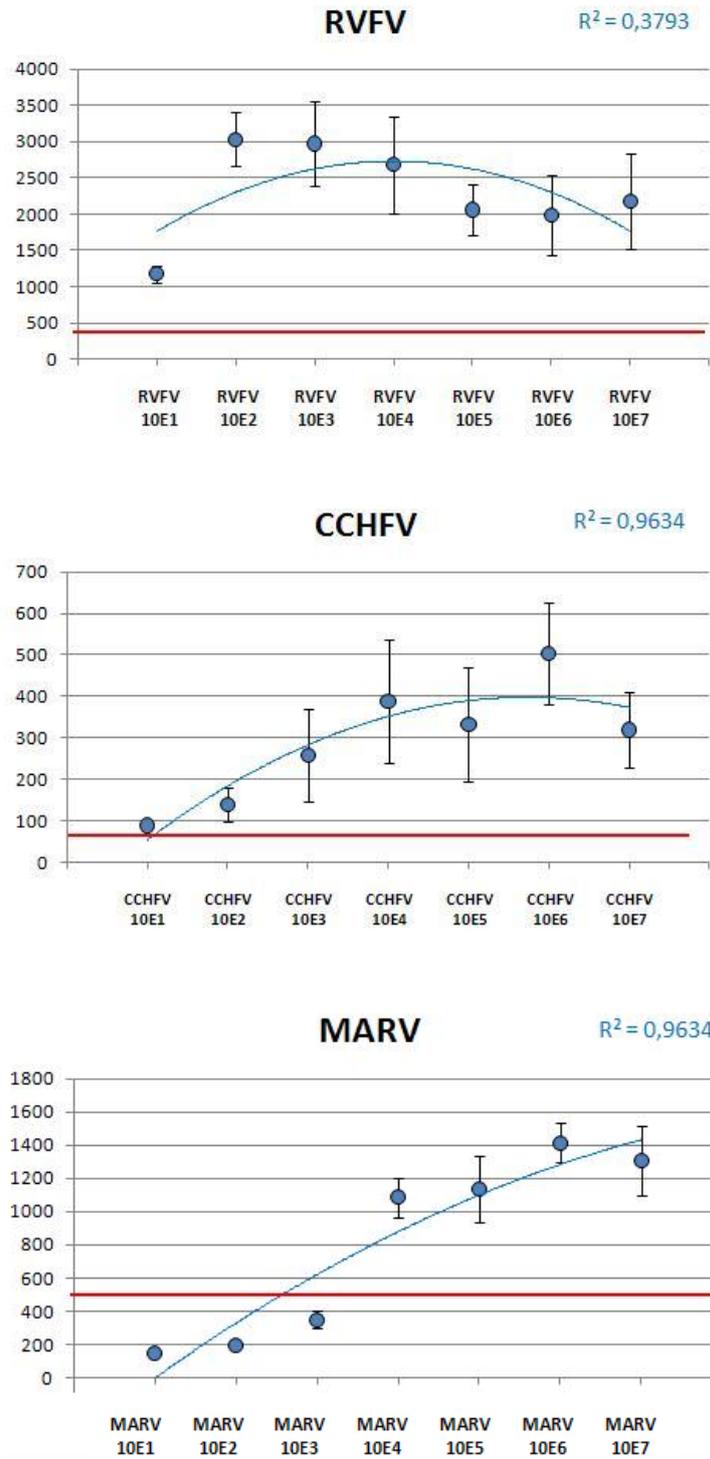
3.3.4 Sensitivitätsmessung im Uniplex-Hybridisierungsverfahren

Zur Evaluierung der Sensitivität des CBAs wurden Hybridisierungen mit quantitativen RNS-Standardreihen ($10^1 - 10^7$ Moleküle/µl) durchgeführt. Nach der Multiplex-RT-PCR wurden die PCR-Amplifikate der RNS-Standardreihen wie in Kap. 2.2.2.3 (S.44) beschrieben bei 60°C für eine Stunde an die Beads hybridisiert. Im Anschluss wurden die Ansätze mit einem SARPE inkubiert und am FACS CantoTM II gemessen. Für jedes Virus wurden die Ansätze in dreifacher Ausführung (n=3) durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit des Verfahrens zu validieren.

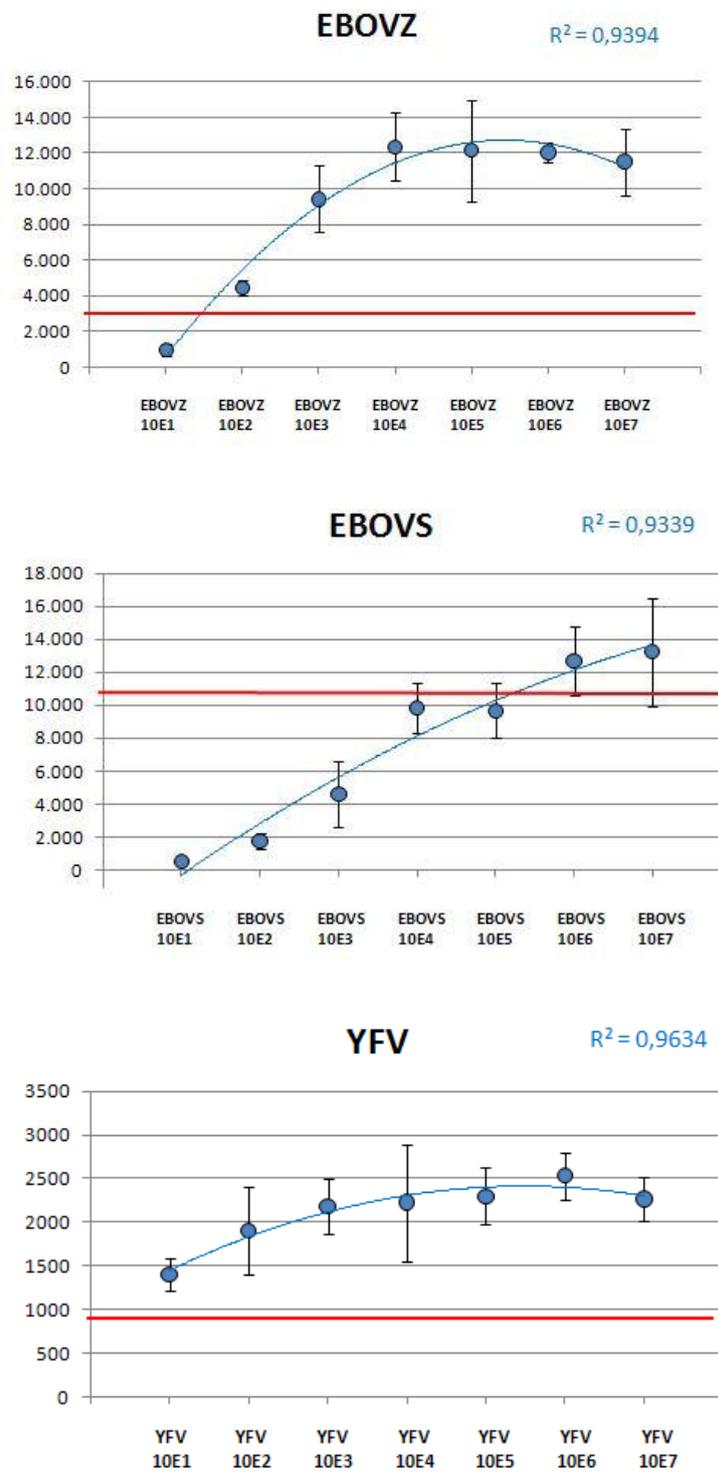
Im Punktdiagramm in Abb. 3.19 sind die MFI-PE der einzelnen HFV in Bezug zur Probenkonzentration aufgetragen. Die Fluoreszenzintensität variierte zwischen den einzelnen Viren zum Teil deutlich. Während EBOVS Maximalwerte bei der Hybridisierung des 10^7 -Standards mit MFI-PE von 13.231 erreichte, traten bei CCHFV nur Maximalwerte bis 503 auf. Die statistische Analyse der Ergebnisse und die Bestimmung der Grenzwerte zur Detektion einer positiven Probe wurden nach den Methoden für jedes HFV individuell errechnet (s. Kap. 3.3.6, S. 76). Dabei wurde ein Grenzwert ($LOD = MW (NK) + 6 \times SD (NK)$) bestimmt und in der Grafik als rote Linie gekennzeichnet. Der polynome Zusammenhang zwischen den Variablen wurden durch das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben. Dabei fiel auf, dass die Werte aller HFV, abgesehen von RVFV, ein vergleichsweise hohes Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,93$ aufwiesen.

Wie sich aus den SD in der Abb. 3.19 ebenfalls entnehmen lässt, zeigten die Ergebnisse einen hohen Grad an Intra-Assay-Reproduzierbarkeit.

MIX 1:



MIX 2:



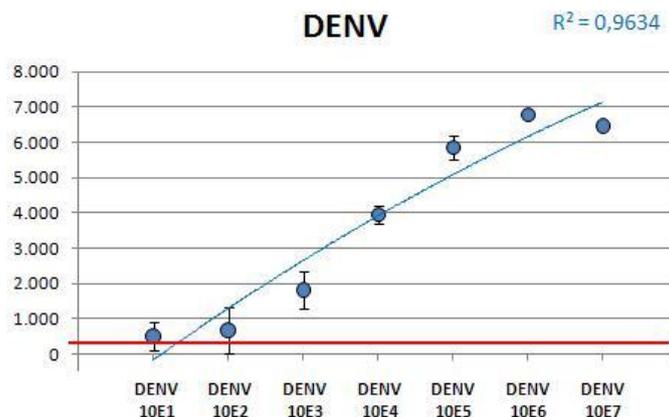
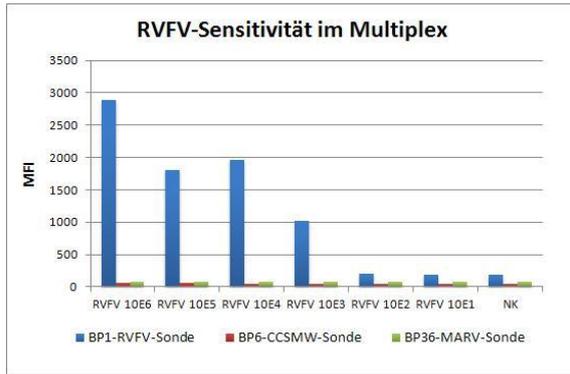


Abb. 3.19: **Sensitivitätsmessungen im Uniplex-Hybridisierungsverfahren der HFV aus Mix 1 und Mix 2.** Aufgetragen wurden die medianen Fluoreszenzintensitäten von Phycoerythrin (MFI-PE) der untersuchten Proben (pro Virus: n=3). Das Bestimmtheitsmaß R^2 wird durch eine polynomische Trendlinie definiert. Der Grenzwert (engl: *limit of detection*, LOD = MW (NK) + 6xSD (NK)) ist durch die rote Linie gekennzeichnet.

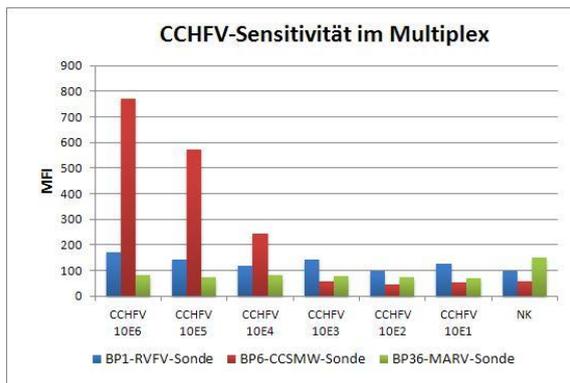
3.3.5 Sensitivitätsmessung im Multiplex-Hybridisierungsverfahren

Ergänzend zu Sensitivitätsmessung im Uniplex-System (s. Kap. 3.3.4, S.70) wurde die Sensitivität der einzelnen CBA-Nachweisverfahren im Multiplex-Hybridisierungsverfahren ermittelt. Die Zusammenstellungen für die Multiplex-Hybridisierung entsprachen den Mixen (Mix 1, Mix 2, Mix 3), die bereits in der Multiplex-RT-PCR (s. Kap. 3.1.2, S.48) und im Multiplex-Hybridisierungsverfahren (s. Kap. 3.3.3, S.65) verwendet wurde. Genau wie bei der Uniplex-Sensitivitätsmessung wurden die PCR-Produkte der RNS-Standardreihen (10^1 - 10^6 Moleküle/ μ l) an die Beads hybridisiert. Jeder Ansatz enthielt wie bei der Multiplex-Hybridisierung in Kap. 3.3.3 (S.65) außer 5 μ l der BP mit der spezifischen Sonde noch 5 μ l von den übrigen gekoppelten Sonden des Mixes. Außerdem wurden je 5 μ l PCR-Produkt von der Multiplex-RT-PCR der Standards (10^1 - 10^7 Moleküle/ μ l) eines Virus hinzugegeben.

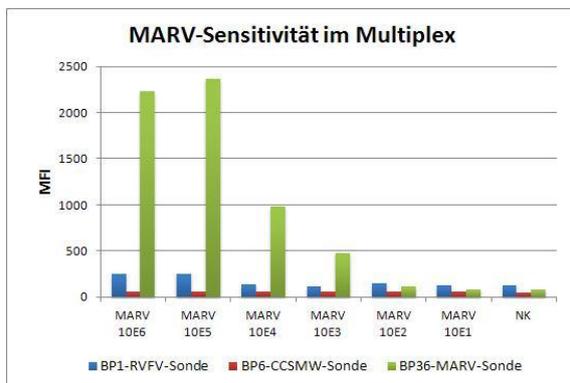
Im Säulendiagramm in Abb. 3.20 werden die Fluoreszenzsignale der Proben aus Mix 1 dargestellt. Auch im Multiplex-System erreichen die Sonden des Mix 1 vergleichbare Fluoreszenzintensitäten wie in der Uniplex-Sensitivitätsmessung: RVFV erzielt MFI-PE-Höchstwerte bis 2.892, CCHFV ist mit einer maximalen MFI-PE von 769 wieder vergleichbar niedrig und die MFI-PE-Maximalwerte von MARV liegen bei 2.370.



	BP1 (RVFV)	BP6 (CCSMW)	BP36 (MARV)
RVFV 10E6	2892	58	84
RVFV 10E5	1810	55	76
RVFV 10E4	1961	47	72
RVFV 10E3	1022	54	73
RVFV 10E2	208	53	74
RVFV 10E1	190	50	76
NK	181	53	79



	BP1 (RVFV)	BP6 (CCSMW)	BP36 (MARV)
CCHFV 10E6	170	769	84
CCHFV 10E5	142	571	73
CCHFV 10E4	119	243	83
CCHFV 10E3	143	59	78
CCHFV 10E2	100	47	76
CCHFV 10E1	128	55	69
NK	97	58	153

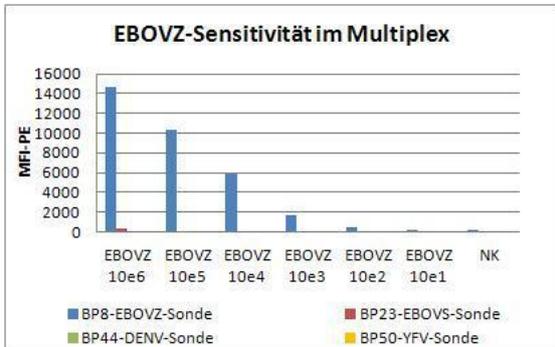


	BP1 (RVFV)	BP6 (CCSMW)	BP36 (MARV)
MARV 10E6	250	59	2226
MARV 10E5	251	58	2370
MARV 10E4	140	61	980
MARV 10E3	119	55	479
MARV 10E2	154	59	119
MARV 10E1	130	55	84
NK	125	47	80

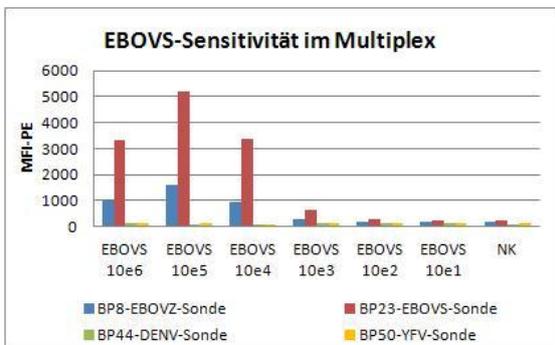
Abb. 3.20: Sensitivitätsmessung im Multiplex-Hybridisierungsverfahren von Mix 1. Aufgetragen wurden die medianen Fluoreszenzintensitäten von Phycoerythrin (MFI-PE) der untersuchten Proben (pro Virus: n=1), die Ergebnisse der spezifischen Sonde sind jeweils dick gedruckt.

Abb. 3.21 zeigt in einem Säulendiagramm die gemessenen Fluoreszenzsignale der Proben aus Mix 2. Bei EBOVZ zeigte die Probe mit dem 10^6 -Standard einen Maximalwert von MFI-PE: 14.598. Bei EBOVS wurde die höchste MFI-PE (5.182) bei der Probe des 10^5 -Standards erreicht und bei YFV erst bei der Probe des 10^4 -RNS-Standard (MFI-PE: 1.125). Der Maximalwert in der Sensitivitätsbestimmung beim DENV im Multiplex-System ist

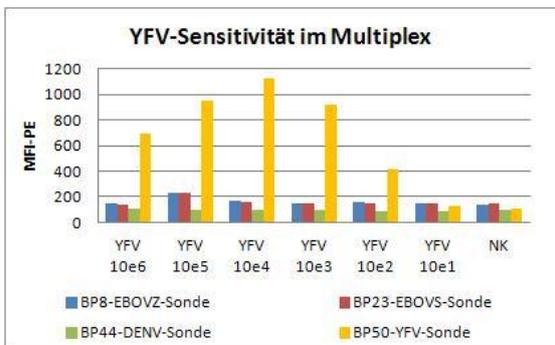
von der Probe des 10⁶-Standards mit einer MFI-PE von 8494 erreicht. Die statistische Analyse und die Berechnung eines Grenzwertes zur Sensitivitätsbestimmung des CBAs werden in Kap. 3.3.6 beschrieben.



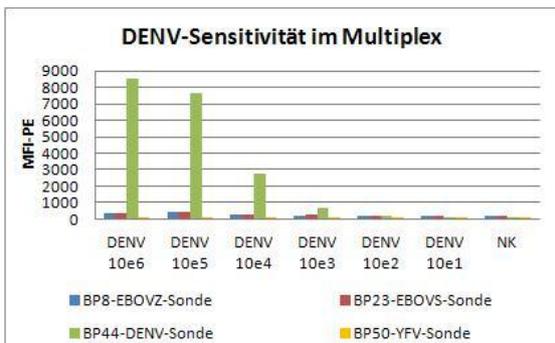
	BP8 (EBOVZ)	BP23 (EBOVS)	BP44 (DENV)	BP50 (YFV)
EBOVZ 10E6	14598	379	93	110
EBOVZ 10E5	10386	324	112	126
EBOVZ 10E4	5874	271	96	106
EBOVZ 10E3	1704	228	114	109
EBOVZ 10E2	488	233	99	112
EBOVZ 10E1	177	225	80	113
NK	162	158	101	127



	BP8 (EBOVZ)	BP23 (EBOVS)	BP44 (DENV)	BP50 (YFV)
EBOVS10E6	1069	3319	112	136
EBOVS 10E5	1590	5182	104	122
EBOVS 10E4	939	3363	104	101
EBOVS 10E3	290	620	138	135
EBOVS 10E2	190	293	115	112
EBOVS 10E1	179	234	109	119
NK	187	227	98	125



	BP8 (EBOVZ)	BP23 (EBOVS)	BP44 (DENV)	BP50 (YFV)
YFV10E6	145	136	103	690
YFV 10E5	235	235	96	947
YFV 10E4	167	156	96	1125
YFV 10E3	147	153	93	916
YFV 10E2	158	148	87	416
YFV 10E1	144	144	91	125
NK	138	145	93	109



	BP8 (EBOVZ)	BP23 (EBOVS)	BP44 (DENV)	BP50 (YFV)
DENV10E6	360	353	8494	116
DENV 10E5	409	418	7673	103
DENV 10E4	258	292	2734	107
DENV 10E3	202	239	659	135
DENV 10E2	167	205	207	105
DENV 10E1	162	210	87	118
NK	174	210	93	107

Abb. 3.21: Sensitivitätsmessung im Multiplex-Hybridisierungsverfahren von Mix 2. Aufgetragen wurden die medianen Fluoreszenzintensitäten von Phycoerythrin (MFI-PE) der untersuchten Proben (pro Virus: n=1), die Ergebnisse der spezifischen Sonde sind jeweils dick gedruckt.

3.3.6 Analyse der Ergebnisse und Grenzwertbestimmung

In der vorliegenden Arbeit ist ein nukleinsäure-basierender CBA für sieben verschiedene HFV entwickelt und für die Verdünnungsstufen 10^1 - 10^6 RNS-Moleküle/ μ l getestet worden. Dabei wurden die Ergebnisse im Uniplex-Hybridisierungsverfahren (s. Kap. 3.3.4, S.70) und im Multiplex-Hybridisierungsverfahren (s. Kap. 3.3.5, S.73) ermittelt. Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des Verfahrens sollte nun ein Grenzwert (LOD, engl.: *limit of detection*) festgelegt werden, der die Mindestfluoreszenzsignale eines Analyten angab, die sicher von einer negativen Probe unterschieden werden können. Aufgrund der starken Inter-Assay-Variation der Fluoreszenzwerte, musste eine Methode entwickelt werden, die eine Grenzwertbestimmung für jeden Versuchsdurchgang individuell ermöglichte. Da die gemessenen Fluoreszenzen nur in Relation zueinander aussagekräftig waren, musste auch der Grenzwert in Relation zur Negativkontrolle interpretiert werden.

Zur Grenzwertbestimmung wurde der Mittelwert (MW) der MFI aller Negativkontrollen aus den Versuchsdurchläufen individuell für jedes Virus errechnet. Dazu wurde jeweils die sechsfache Standardabweichung ($6 \times SD$, engl.: *standard deviation*) der Negativkontrollen addiert.

$$\text{Grenzwert (LOD)} = \text{MW (NK)} + 6 \times \text{SD}$$

Wenn nur ein einziger Versuchsdurchlauf ($n=1$) durchgeführt wurde, können zur Bestimmung des MW (NK) auch die Ergebnisse der unspezifischen Proben herangezogen werden, da sie genauso eine Aussage über unspezifisches Hintergrundrauschen geben wie die NK.

Bei der Bestimmung der Grenzwerte im Uniplex-Hybridisierungsverfahren (aus Kap. 3.3.4), $n=3$, ergaben sich für die sieben HFV folgende Grenzwerte:

Tab. 3.2: Grenzwerte (LOD) der Viren aus Mix 1 und Mix 2

MIX 1		MIX 2	
Name des Sonde	Grenzwert (LOD)	Name des Sonde	Grenzwert (LOD)
RVFV	313	EBOVZ	2411
CCSSMW	74	EBOVS	10470
MARV	500	YFV	910
		DENV	289

Bei der Anwendung dieser Grenzwerte im Uniplex-System sollte die Sensitivität demnach als die Mindestkonzentration definiert sein, die eine MFI-PE oberhalb des Grenzwertes aufwies:

Tab. 3.3: Sensitivität der Hybridisierungsreaktionen im Uniplex-System

MIX 1			MIX 2			
RVFV	CCHFV	MARV	EBOVZ	EBOVS	YFV	DENV
10^1	10^1	10^4	10^2	10^3	10^1	10^1

Bei CCHFV gestaltete sich die Auswertung des Grenzwertes als schwierig, da eine NK außergewöhnlich hohe MFI-PE besaß und deshalb als „Ausreißer“ definiert werden musste und aus der Analyse herausgenommen wurde. Die Bestimmung des Grenzwertes wurde deshalb nur mit den Ergebnissen der NK1 durchgeführt. Auf die gleiche Weise mussten auch die Ergebnisse von EBOVS ausgewertet werden, da auch hier die NK2 unerklärlich hohe Werte zeigte. Die Sensitivität, die anhand der Ergebnisse von NK1 errechnet wurde, lag bei einer Konzentration von 10^3 .

Das Verfahren zur Grenzwertbestimmung wurde auf dieselbe Weise auch für das Multiplex-Hybridisierungsverfahren angewendet. Die dabei verwendeten Ergebnisse stammten aus der Versuchsreihe zur Multiplex-Sensitivitätsbestimmung in Kap. 3.3.5 (S.73) (n=1):

Tab. 3.4: Sensitivität der Hybridisierungsreaktionen im Multiplex-System

MIX 1			MIX 2			
RVFV	CCHFV	MARV	EBOVZ	EBOVS	YFV	DENV
10^3	10^5	10^3	10^2	10^3	10^2	10^3

Bei Mix 1 scheint MARV in der Multiplex-Hybridisierung (10^3) bessere Sensitivitäten zu erreichen als in der Uniplex-Hybridisierung (10^4). RVFV und CCHFV erreicht eine schlechtere Sensitivität in der Multiplex-Hybridisierung.

In Mix 2 weisen YFV und DENV eine leichte Verschlechterung der Sensitivität auf, EBOVZ und EBOVS, bleiben mit einer Sensitivität von 10^2 bzw. 10^3 unverändert.

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der ermittelten LOD-Werte wurde der p-Wert mithilfe des Students-t-Tests bestimmt. Mithilfe des p-Wertes konnte mit einer Wahrscheinlichkeit, die kleiner als 5% ($<0,05$) ist, ausgeschlossen werden, dass der gemessene Unterschied zwischen einer positiven Probe und der NK nur auf Zufall beruht.

Tab. 3.5: Statistische Signifikanz (p-Wert) von MIX 1 Konzentrationen, deren p-Wert nicht $<0,05$ ist, sind durch dick gedruckte Schrift hervorgehoben

RVFV		CCHFV		MARV	
Konz. (Moleküle/ μ l)	p-Wert	Konz. (Moleküle/ μ l)	p-Wert	Konz. (Moleküle/ μ l)	p-Wert
10^1	0,0056	10^1	0,7679	10^1	0,1998
10^2	0,0060	10^2	0,3533	10^2	0,0087
10^3	0,0150	10^3	0,3588	10^3	0,0314

Tab. 3 .6: Statistische Signifikanz (p-Wert) von MIX 2 Konzentrationen, deren p-Wert nicht $<0,05$ ist, sind durch dick gedruckte Schrift hervorgehoben

EBOVZ		EBOVS		YFV		DENV	
Konz. (Moleküle/ μ l)	p-Wert						
10^1	0,046	10^1	0,167	10^1	0,005	10^1	0,000
10^2	0,002	10^2	0,071	10^2	0,041	10^2	0,001
10^3	0,013	10^3	0,087	10^3	0,013	10^3	0,012

Lediglich CCHFV und EBOVS erreichen bei den Verdünnungen $<10^3$ keinen p-Wert $<0,05$. Auch bei MARV fällt auf, dass bei einer Konzentration von 10^1 keine statistische Signifikanz vorliegt, da der p-Wert $>0,05$ ist. Für RVFV, EBOVZ, YFV und DENV hingegen konnte eine statistische Signifikanz bis zur kleinsten Verdünnungsstufe bestätigt werden. Bei dem Vergleich zwischen der statistischen Signifikanz und der analytischen Sensitivität, die mit dem LOD ermittelt wurde, ergaben sich folgenden Werte:

Tab. 3.7: Vergleich der Mindestkonzentration von statistischer Signifikanz mit der durch den LOD-ermittelten Sensitivität im Uniplex-System bei MIX 1 und 2.

		Sensitivität per t-test (p-Wert $<0,05$) (Moleküle/ μ l)	Sensitivität per LOD (Moleküle/ μ l)
MIX1	RVFV	10^1	10^1
	CCHFV	$>10^7$	10^1
	MARV	10^3	10^4
MIX2	EBOVZ	10^1	10^2
	EBOVS	10^4	10^3
	YFV	10^1	10^1
	DENV	10^1	10^1

Für RVFV, YFV und DENV entsprach die ermittelte Sensitivität (10^1 Moleküle/ μ l) des CBAs der Mindestkonzentration mit einer statistischen Signifikanz (p-Wert $<0,05$). Für MARV (10^3 Moleküle/ μ l) und EBOVZ (10^1 Moleküle/ μ l) lässt sich selbst noch bei Konzentrationen unterhalb der Sensitivität (10^4 bzw. 10^2 Moleküle/ μ l) ein signifikanter Unterschied zur NK bestimmen. Die Mindestkonzentration der statistischen Signifikanz für EBOVS (10^4 Moleküle/ μ l) liegt allerdings oberhalb der Sensitivität im CBA (10^3 Moleküle/ μ l). Die Ergebnisse für CCHFV zeigen, dass der CBA sogar bis zur höchsten Konzentration (10^7 Moleküle/ μ l) keine statistische Signifikanz aufweist, während mithilfe des Grenzwertes (LOD) eine Sensitivität bis zu 10^1 Moleküle/ μ l determiniert wird.

3.3.7 Kreuzreaktionstestung im Multiplex-Hybridisierungsverfahren

Um die Spezifität des CBAs zu bestimmen, sollten die Oligonukleotidsonden auf Kreuzreaktionen untersucht werden. In der Multiplex-Hybridisierung wurden die Kreuzreaktionen innerhalb der Mixe ausgeschlossen (s. Kap. 3.3.3, S.65). Lediglich die EBOVZ-Sonde wies eine leichte Kreuzreaktion bei dem EBOVS-Genom auf. In diesem Versuch sollten auch die Kreuzreaktionen mit den Genomen der Viren aus dem anderen Mix getestet werden.

Die Proben wurden, wie bei der Multiplex-Hybridisierung, mit den Beads des gesamten Mixes angesetzt. Dazu wurden zur Hybridisierung je PCR-Amplifikate von einem 10^6 -Standard eines unspezifischen Virus gegeben und nach dem Hybridisierungsverfahren in Kap. 2.2.2.3 (S.44) bei 60°C hybridisiert und zur Detektion in SARPE inkubiert.

Die Ergebnisse des Kreuzreaktionstestes mit den Oligonukleotidsonden aus Mix 1 und Mix 2 sind im Säulendiagramm in Abb. 3.22 dargestellt. Die spezifischen Sonden zeigen jeweils einen deutlichen Anstieg der MFI-PE-Signale. Bei keiner der unspezifischen Oligonukleotidsonden kann ein eindeutiger Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden. Zur Interpretation der Ergebnisse diente das Verhältnis zum MW der Negativkontrollen. Im Vergleich zum MFI-PE-MW der NK-Proben erreichte die RVFV-Sonde bei Zugabe der spezifischen Probe einen 14,4-fach höheren Wert, die CCSMW-Sonde einen 15,8-fach höheren Wert und die MARV einen 11,7-fachen Wert. Die Sonden des Mix 2 erreichten zum Teil noch sehr viel höhere Werte im Vergleich zur Kontrollprobe: EBOVZ-Sonde kam auf 44,1-fache Werte und die DENV-Sonde auf 57,8-fache Werte. Bei der EBOVS-Sonde war es weniger stark aber dennoch eindeutig mit einem 9,6-fach höheren Wert bei der spezifischen Probe. Bei der YFV-Sonde zeigte sich eine 17,9-fach höhere Fluoreszenzintensität.

Kreuzreaktivitäten wurden im CBA allgemein nicht beobachtet. Wie in der Multiplex-Hybridisierung (s. Kap. 3.3.3, S.65) kam es in der Probe der EBOVZ-Sonde bei der Zugabe von EBOVS zum wiederholten Male zu einem leichten Anstieg der MFI-PE, die immerhin 0,3-fach höher war als die MFI-PE der spezifischen EBOVS-Sonde.

Diese Daten demonstrieren eine gute Spezifität des CBAs und beweisen, dass keine unspezifischen Bindungen an die Oligonukleotidsonden stattgefunden haben.

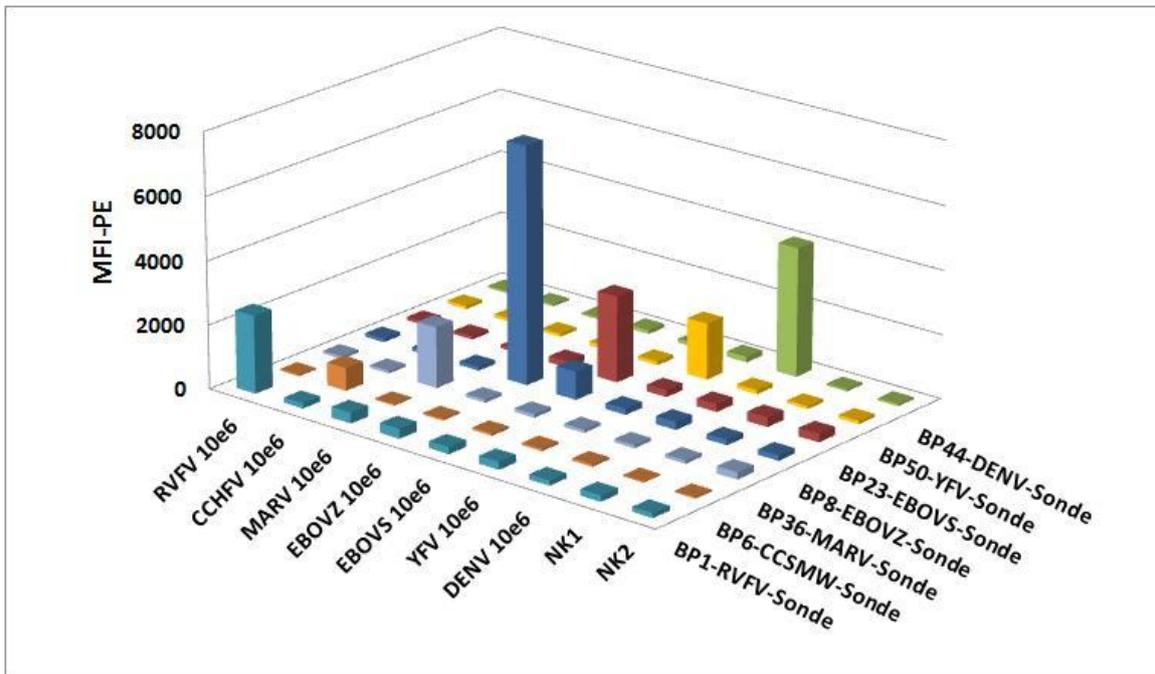


Abb. 3.22: Kreuzreaktionstest mit den Sonden von Mix 1 und Mix 2. Aufgetragen wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten von Phycoerythrin (MFI-PE) der untersuchten Proben (pro Virus: n=1).

3.4 Vergleich der Sensitivität der verschiedenen Nachweisverfahren für hämorrhagische Fiebertviren

Um die Bedeutung des CBAs als Diagnostikmittel für HFV einzuschätzen, benötigt es einen Vergleich der Sensitivität des CBA zu der Sensitivität einer Real-Time-PCR für dieselben HFV hergestellt werden.

Für die Real-Time-PCR wurden die gleichen Primerpaare und Mixe verwendet. Die Sequenzen der TaqMan-Sonden entsprachen den Sequenzen der Oligonukleotidsonden, die an die Beads gekoppelt wurden. Das PCR-Protokoll entsprach dem Protokoll in Kap. 2.2.1.3.6 (S.39). In Tab. 3.8 werden die Sensitivitäten der qRT-PCR, der Uniplex-Hybridisierung und der Multiplex-Hybridisierung zusammengefasst. Dafür werden die Referenzdaten für den CBA aus den statistischen Auswertung in Kap. 3.3.6 herangezogen.

Tab. 3.8: Sensitivität für Mix 1 und Mix 2 von qRT-PCR und CBA im Uniplex- und im Multiplex-System im Vergleich.

	Uniplex-CBA	Multiplex-qRT-PCR	Multiplex-CBA
RVFV	10 ¹ 	10 ³	10 ³
CCHFV	10 ¹ 	10 ³	 10 ⁵
MARV	10 ⁴	 10 ³	10 ³
EBOVZ	10 ²	10 ²	10 ²
EBOVS	10 ³		 10 ³
YFV	10 ¹ 	10 ²	10 ²
DENV	10 ¹ 	10 ²	 10 ³

Beim Vergleich der Ergebnisse von beiden Diagnostikverfahren lässt sich erkennen, dass die Sensitivitäten bei ähnlichen Konzentrationen liegen.

Nur bei zwei Viren (MARV, EBOVS) erreicht die qRT-PCR bessere Ergebnisse als der CBA im Uniplex-System. Bei den übrigen Viren (RVFV, CCHFV, YFV, DENV) erweist sich der CBA als sensitiver oder als vergleichbar sensitiv (EBOVZ) zur qRT-PCR. Die Ergebnisse des CBA im Multiplex-System sind zwar weniger sensitiv als im Uniplex-System aber erreichen bei RVFV, MARV, EBOVZ und YFV immer noch Sensitivitäten, die mit denen der qRT-PCR vergleichbar sind. Die Ergebnisse des Multiplex-Hybridisierungsverfahren von EBOVS und DENV sind jeweils eine 10er-Potenz schwächer als in der qRT-PCR.

Die Ergebnisse von CCHFV müssen kritisch beurteilt werden, da bei der Uniplex-Hybridisierung von CCHFV in der Grenzwertermittlung eine NK-Probe nicht berücksichtigt werden konnte und aus diesem Grund die SD nur sehr niedrig gewesen sind (s. Kap. 3.3.6, S.76).

Durch den Vergleich mit der qRT-PCR, einem bereits etablierten diagnostischen Verfahren für HFV, wird deutlich, dass das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren meist nur leicht schwächere und zum Teil sogar gleiche Sensitivitäten erreichte und damit das Potential besitzt, in der Routinediagnostik als Diagnostikmittel verwendet zu werden.

4 Diskussion

Als sensitives Multiplexverfahren ermöglicht der CBA die multiple Simultandetektion verschiedener Parameter aus einer einzigen Probe. Durch die Option, Antigene, Antikörper, Zytokine oder Oligonukleotidsonden an die Beads zu koppeln, ist der CBA vielfältig einsetzbar. Die Bindungskinetik in Flüssigkeit im Gegensatz zur Kinetik mit immobilisierten Bindungspartnern ist deutlich verbessert. Außerdem handelt es sich bei dem CBA um eine schnelle, einfach handhabbare und verlässliche Methode, die nur ein geringes Probenvolumen benötigt. Der CBA erfüllt also alle Bedingungen, die an ein molekulares Diagnostikverfahren für ein Multiplexsystem gestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein CBA zum Nachweis der Nukleinsäuren von acht afrikanischen hämorrhagischen Fiebertviren auf Basis von an Beads hybridisierten Oligonukleotidsonden entwickelt worden.

Virale hämorrhagische Fieber sind eine akute Infektion mit einer hohen Infektions- und Mortalitätsrate. Das Interesse an den Erregern der VHF ist in den letzten Jahren deutlich angestiegen. Einerseits hat das Potential zum Missbrauch als biologischer Kampfstoff zur größeren Beachtung der HFV beigetragen (Borio et al. 2002, Franz et al. 1997). Andererseits ist das Infektionsrisiko in Nicht-Epidemiegebieten aufgrund einer erhöhten Reisefreudigkeit angestiegen (CDC 2011).

Wie in Kap. 1.2.1 bereits beschrieben erfolgte die Routinediagnostik bislang üblicherweise durch die Kombination von Virusisolation (Slenczka 1999), serologischen (*antigen-capture* ELISA, IgM-/IgG-Antikörper-Detektion) (Gear et al. 1975) und molekularen Methoden (z.B. PCR, qRT-PCR) (Digoutte et al. 1992, Saluzzo, Le Guenno 1987). Dennoch müssen für die VHF Diagnostik mehrere besondere Herausforderungen bedacht werden: (1) bei Verdacht auf VHF muss eine Patientenprobe auf mehrere HFV getestet werden, da die Symptome der VHF nur unspezifisch sind und keine klinische Differentialdiagnose zulassen, (2) bei einem Ausbruch kann es zu einer schnellen Verbreitung der Infektion kommen, sodass eine frühe und simultane Analyse mehrerer Proben entscheidend ist und (3) um das gesamte diagnostische Fenster abzudecken,

müssen molekulare und serologische Methoden miteinander kombiniert werden. Um auf diese Problematik einzugehen soll der CBA dieser Arbeit mit weiteren CBAs zur Detektion von Antikörpern und Zytokinen für die gleichen acht HFV kombiniert werden. Multiplex-CBAs zur Detektion von Antikörpern und Zytokinen für HFV-Infektionen werden im *Institute Pasteur de Dakar* im Senegal zur Zeit im Rahmen einer Kooperation mit dem Virologischen Institut der Georg-August-Universität (Multi-parameter and high throughput diagnostic platform for viral hemorrhagic fever, PTR 273 Projekt) entwickelt. Zur Detektion viraler Genome sind bereits verschiedene CBAs entwickelt worden: Respiratorische Viren (Horejsh et al. 2005, Letant et al. 2007), Papillomaviren (Jiang et al. 2006, Oh et al. 2007, Schmitt et al. 2006) (Wallace et al. 2005), Pestviren (Deregt et al. 2006) und HIV-1 Genotypen (Greve et al. 2009). Des Weiteren hat Taniuchi et al. im Jahr 2011 einen CBA zur Detektion von parasitären Genomen veröffentlicht (Taniuchi et al. 2011). Bezüglich HFV-Infektionen ist bisher lediglich ein CBA zum Antikörpernachweis für DENV entwickelt worden (Shu, Huang 2004). Ein molekulares Diagnostikverfahren, das der Detektion von HFV-Genomen im Multiplexsystem dient, ist bislang noch nicht beschrieben worden. Da der Nachweis von Antikörpern gegen HFV oftmals erst nach einigen Tagen durchgeführt werden kann, spielt der AK-Nachweis in der Akutphase der Erkrankung meist keine Rolle. Für die akute HFV-Erkrankung mit derart hoher Letalität und Infektiosität ist es wesentlich aussichtsreicher die Diagnostik innerhalb der ersten Tage nach Infektion durch den direkten Virusgenomnachweis durchzuführen.

Für die Entwicklung des CBAs in der vorliegenden Arbeit wurden anfangs Multiplex-RT-PCRs etabliert. Die Kombination eines Multiplex-CBAs mit einer vorangegangenen Multiplex-PCR ist bereits mehrfach erfolgreich durchgeführt worden (Armstrong et al. 2000, Hindson et al. 2008, Lee et al. 2007, Letant et al. 2007, Taniuchi et al. 2011, Wallace et al. 2005). Die Diagnostik mit dem CBA ist durch diese synchrone Amplifikation mehrerer Produkte vereinfacht, zeitsparend und kostensparend.

Für die Multiplex-PCR in dieser Arbeit wurden spezifische Primerpaare synthetisiert, die im Anschluss zu drei Primermixen für die Multiplex-PCR kombiniert wurden (s. Kap.3.1.2). Zu den acht afrikanischen HFV, die mit dem CBA detektiert wurden, gehören: LASV (*Arenaviridae*), RVFV, CCHFV (*Bunyaviridae*), MARV, EBOVZ, EBOVS (*Filoviridae*),

YFV, DENV (*Flaviviridae*). Dabei beruhen die RNS-Standards auf bereits veröffentlichten Ergebnissen (Weidmann 2004, 2008, 2010). Es mussten lediglich die Primer und Sonden für CCHFV und LASV neu entwickelt werden. Dabei wurden für die Entwicklung der Primer und der Sonde von CCHFV nur afrikanische Sequenzen berücksichtigt.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Hybridisierungsreaktion an die gekoppelten Beads wurden biotinylierte RP verwendet. Durch das Biotin im PCR-Produkt war nach der Inkubation in SARPE eine Detektion in der Durchflusszytometrie möglich.

Die PCR hat sich in der Diagnostik als wichtiges Instrument etabliert, da sie eine schnelle, simultane Detektion von Pathogenen im Multiplexsystem erlaubt. Durch eine Kombination mehrerer spezifischer Primerpaare können Amplifikationsartefakte entstehen (Fan et al. 2006). Wie Broude et al. und Syvanen et al. bewiesen, sind in PCRs bis zu 10 simultane Amplifikationenreaktionen möglich, bevor es zur Akkumulation von unspezifischen Produkten kommt (Broude et al. 2001, Syvanen 2005). Dennoch präsentiert sich gerade die Multiplex-PCR als komplexes Diagnostikverfahren, sodass nur vergleichsweise wenige veröffentlichte Multiplex-PCRs existieren (Weidmann et al. 2008).

Die Primer und Sonden müssen perfekt aufeinander abgestimmt werden, wobei die Schmelztemperatur T_{MP} der Primer, die Schmelztemperatur T_{MS} der Sonden, die Länge der Amplikons und die Schmelztemperatur T_{MA} des Amplikons berücksichtigt werden muss, um Primerdimerbildung zu verhindern. Durch verschiedene Programme (z.B. Primer Select, Primer Express, Oligo3, DNAsis) können Primerdimere vorausgesagt werden. Diese Prognosen sind jedoch nicht hundertprozentig verlässlich.

Um die Konkurrenz der Einzelreaktionen untereinander zu minimieren, wurden die Multiplex-PCRs in drei Primermischungen unterteilt. Taniuchi et al. beschrieb ebenfalls, dass die Aufteilung in 2- bzw. 3-plex-PCRs die Effektivität des Amplifikationsverfahrens für den CBA verbessert (Taniuchi et al. 2011), da auf diese Weise Kreuzreaktionen vermieden werden können.

Zur Ermittlung der optimalen Primerkombinationen wurden die verschiedenen Multiplex-Ansätze per SYBR-Green-qRT-PCR auf Primerdimerbildungen untersucht.

Dabei stellten sich die Kombination von (1) RVFV, CCHFV und MARV und (2) EBOVZ, EBOVS und YFV als besonders effektiv heraus (s. Abb. 3.3, S.50), da sie kaum Primerdimerbildungen aufwiesen. DENV wurde erst im Anschluss in den Mix 2 aufgenommen, da sich im Agarosegel nach einer Multiplex-PCR mit Primermix 2 deutlichere spezifische Banden zeigten als bei der Kombination mit Primermix 1 (s. Abb. 3.4, S.51). Die LASV-Primer wurden als eigenständiger Mix 3 zusammen gefügt.

Wie Deregt et al. bereits für einen mRT-PCR-Luminex-CBA zur Detektion von Schweinefieber und Pestviren und Horejsh et al. bei der Entwicklung eines CBAs für 4 respiratorischen Viren untersucht hatten, wurde durch die Verwendung eines asymmetrischen Primerverhältnisses die Fluoreszenzintensität erhöht (Deregt et al. 2006, Horejsh et al. 2005). Als Begründung wurde von Deregt et al. und Horejsh et al. vermutet, dass die Ziel-DNS, die in der symmetrischen PCR entstand, durch Wiederanlagern der Einzelstränge zu Doppelsträngen die Hybridisierung der Oligonukleotidsonde verhinderte. Ein Vorteil der asymmetrischen PCR könnte also dadurch zustande kommen, dass bei einem Verhältnis, das zugunsten der RP verschoben wird, mehr einzelsträngige DNS generiert wird, die zur Oligonukleotidsonde komplementär ist, und deshalb die Effizienz der Hybridisierung an die bead-gekoppelten Sonden erhöht wird (Deregt et al. 2006).

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Primer mit verschiedenen FP/RP-Verhältnissen (4:1 bzw. 1:4) in der Multiplex-RT-PCR getestet um das effizienteste Verhältnis für jeden Mix individuell zu bestimmen, wobei die Amplifikate im 2%igen Agarosegel analysiert wurden.

Während im Mix 1 das 4:1-FP/RP-Verhältnis bei der Auswertung auf dem Agarosegel deutlichere spezifische Banden zeigte, erzielte das 1:4-RP/FP-Verhältnis im Mix 2 und Mix 3 bessere Resultate. Basierend auf den Ergebnissen von Deregt et al. und Horejsh et al. ist ein direkter Vergleich der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer von PCR-Produkten aus symmetrischer und asymmetrischer PCR nicht durchgeführt worden. Entgegen der Erwartungen können diese Ergebnisse mit der unterschiedlichen Polarität der Virusgenome nicht hinreichend erklärt werden. Mix 1 enthält Primer für die Bunyaviren RVFV und CCHFV sowie für das Filovirus MARV, deren Genome jeweils als

negativer Einzelstrang (ss(-)RNS) vorliegen, d.h. die Replikation findet in 3' -> 5'- Leserichtung statt. Wie gezeigt erhöht das FP/RP-Verhältnis 4:1 zugunsten des FP aus diesem Grund die Effektivität der Amplifikation. Mix 2 hingegen enthält sowohl Primer für die Flaviviren YFV und DENV mit positivsträngigem Einzelstranggenom (ss(+))RNS) als auch Primer für die Filoviren EBOVZ und EBOVS mit negativsträngigem Einzelstranggenom (ss(-)RNS). Dennoch konnte nur das FP/RP-Verhältnis von 1:4 die Effektivität des Primermixes steigern. Mix 3 enthielt Primer für das LASV, einem Arenavirus mit negativem Einzelstranggenom (ss(-)RNS) und erzielte mit dem 1:4-Primerverhältnis bessere Ergebnisse. Hier hätte man eher ein Ergebnis wie in Mix 1 erwartet.

Eine nahe liegende Begründung für die Tatsache, dass einige asymmetrische Primerverhältnisse effizienter sind als andere, könnten Primerinteraktionen mit dem RNS-Zielmolekül sein. Schließlich kann der Zugang der PCR zum RNS-Molekül durch die Ausbildung komplizierter Sekundärstrukturen wie Haarnadelstrukturen oder G-Quadruplexen erschwert bis unmöglich gemacht werden (Kuo et al. 1997, Myers, Gelfand 1991).

Um spezifische PCR-Produkte nach der Multiplex-RT-PCR zu isolieren, wurden die PCR-Produkte mit dem MinElute-Purification-Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Durch die Aufreinigung wurden alle Nukleinsäuren, die <70bp bzw. > 4kb waren, und alle Proteine entfernt. Ergänzend wurde, während der Reinigung mit dem MinElute-Purification-Kit, ein weiterer Waschschriff mit 750µl Guanidiniumhydrochlorid (35%) durchgeführt, um Primerdimere größer als 20bp zu entfernen.

Durch den Aufreinigungsvorgang mit dem MinElute-Purification-Kit ließ sich im Mix 1 eine Verbesserung der Fluoreszenzsignale im Durchflusszytometer erreichen, da nach der Aufreinigung der PCR-Amplifikate ein deutlich positiveres Fluoreszenzsignal messbar war. So ließ sich bei der Uniplex-Hybridisierung von RVFV bei einer Konzentration von 10^6 Molekülen/µl ein 2-fach, bei MARV ein 2-fach und bei CCHFV ein 6-fach stärkeres MFI-PE-Signal messen. Eine Hybridisierung an die gekoppelten Sonden war im Mix 1 ohne MinElute-Purification-Kit nicht möglich. Bei den Proben der Mixe 2 und 3 war die Aufreinigung jedoch nicht nötig. Dies ließ darauf schließen, dass die Multiplex-PCR in Mix

2 und Mix 3 besser aufeinander abgestimmt war und deshalb weniger Primerdimere entstanden. Der Vergleich der Primerdimerbildung in den Mixen 1, 2 und 3 in der SYBR-Green-qRT-PCR (s. Kap. 3.1.3, S.51) bewies, dass der Ct-Wert von Mix 1 (RVFV-CCHFV-MARV) wesentlich niedriger (12) war, als der Ct-Wert von Mix 2 (EBOVZ-EBOVS-YFV-DENV) (20) und Mix 3 (LASV) (26). Da ein niedriger Ct-Wert in der SYBR-Green-qRT-PCR auf eine starke Dimerbildung deutet, bestätigte dieses Ergebnis die Vermutung, dass die Primerdimerbildung in Mix 1 deutlich höher sein musste als in den anderen Mixen.

Bei der Analyse der FP von Mix 1 fällt auf, dass sich die Primer RVF-FP und der MBR-FP2, an den 3'-Enden in ihrer bp-Zusammenstellung ähneln. Die letzten 5 bp am 3'-Ende sind bis auf ein bp sogar identisch (RVF-FP: -AGCCA-3', MBR-FP2: -AGACA-3'). Da an diesem Ende die Elongation durch die Polymerase beginnt, ist dieser Abschnitt der Primer besonders entscheidend für die Spezifität der PCR. Aus diesem Grund kann es zu einer vermehrten unspezifischen Bindung in Mix 1 gekommen sein. Hier ist eventuell eine Optimierung durch Veränderung eines der Primer möglich.

Um die biotinylierten PCR-Produkte an die Beads zu binden, mussten zuvor aminierte Oligonukleotidsonden an die carboxylierten Kugeln gekoppelt werden. So konnten die PCR-Amplifikate anschließend an die immobilisierten Oligonukleotidsonden hybridisiert werden.

Die Kopplungsreaktion erfolgte über eine Carbodiimid-Reaktion, in der die funktionellen Carbonsäuregruppen der Beads durch den Kreuzvernetzer EDAC aktiviert wurden und daraufhin eine kovalente Bindung mit den freien Aminogruppen der DNS-Sonden eingingen. Für die Kontrolle der Kopplungsreaktion wurde eine CCHFV-Sonde verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert war. Die übrigen von „TIB MOLBIOL“ angebotenen Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung des 3'-Ende von Oligonukleotidsonden konnten aus verschiedenen Gründen nicht verwendet werden: TAMRA, ROX und Cy 5.5 können vom FACS CantoTM II nicht detektiert werden und Cy5 (667 nm) überschneidet sich mit seinem Emissionsspektrum mit dem Spektrum von APC (660 nm), das in den Beads enthalten ist. Ein Nachteil des Cy3 blieb allerdings die Tatsache, dass es sich als Fluoreszenzfarbstoff zur Überprüfung der Kopplungsreaktion mit PE, dem Fluoreszenzfarbstoff zur Überprüfung der Hybridisierungsreaktion, im

Emissionsmaximum überschritt. Eine direkte Kontrolle der Kopplung war deshalb während einer Hybridisierungsreaktion nicht möglich. Insofern konnte eine misslungene Kopplung der Oligonukleotidsonde an die Beads nie als Fehlerquelle für falsch negative Fluoreszenzsignale ausgeschlossen werden.

Das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes Cy3 von der CCHFV-Kontrollsonde wurde im PE-Kanal des Durchflusszytometers detektiert. Zum Vergleich diente eine Negativkontrolle mit Beads, zu denen H₂O anstelle der Oligonukleotidsonden zugegeben wurde.

Das Fluoreszenzsignal der Probe mit den gekoppelten Sonden war 83-fach höher als das Signal der Negativkontrolle. Die erfolgreiche Kopplungsreaktion konnte damit bestätigt werden. Um die Zuverlässigkeit der Kopplungsreaktion zu überprüfen, wurde in den ersten Versuchsreihen jeweils eine Kopplungskontrolle mit einer Cy3-markierten-Sonde mitgeführt. Bei der Auswertung am FACS Canto™ II zeigte sich, dass die Kopplungsreaktion zuverlässig funktionierte und nur geringen Schwankungen (MFI von 22242 – 39480, n=7) unterlag. Aus diesem Grund wurde die Kopplungskontrolle aus Kostengründen bei den späteren Versuchsreihen nicht mehr mitgeführt.

Die wiederholte Zugabe von EDAC war essentiell für die Kopplung. Eine ergänzende Zugabe von S-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide), wie es vom Hersteller der Beads (Bio Rad Laboratories GmbH) empfohlen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Die Kopplungsreaktion wurde ursprünglich mit S-NHS ausprobiert und lieferte keine positiven Ergebnisse. Erst durch die Entwicklung eines Kopplungsverfahrens, das ohne S-NHS aber mit zweifacher Gabe von EDAC durchgeführt wurde, konnte eine erfolgreiche Kopplungsreaktion nachgewiesen werden. Mehrfache EDAC-Zugabe während der Kopplungsreaktion ist schon aus verschiedenen Publikationen bekannt (Armstrong et al. 2000, Hindson et al. 2008, Rockenbauer et al. 2005, Taniuchi et al. 2011).

Wie Wittebolle et al. bereits gezeigt hatte, konnte bei der Kopplung von Oligonukleotiden an Beads durch die Verwendung eines MES-Borat-Puffers mit einem pH von 4,5 die Kopplungseffizienz drastisch angehoben (Wittebolle et al. 2006) und Hintergrundsignale minimiert werden. Inzwischen ist die Verwendung von MES (pH 4,5) ein etabliertes Verfahren zur Kopplung bei CBAs und wurde schon in mehreren

Veröffentlichungen angewendet (Deregt et al. 2006, Letant et al. 2007, Oh et al. 2007, Schmitt et al. 2006), weshalb MES (pH 4,5) auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.

Grundsätzlich bleibt das Kopplungsverfahren noch optimierbar. Eine deutliche Effizienzsteigerung wurde durch das Zufügen von BSA-Puffer erreicht, da auf diese Weise freie COOH-Gruppen abgesättigt wurden (s. Kap. 3.3.1.3., S.62). Eventuell könnte die Kopplungsreaktion durch ein besseres Verhältnis von Oligonukleotidsonden zu Beads oder durch Optimierung der Reaktionsbedingungen (z.B.: Lagerungsbedingungen, erhöhte Zugabe von EDAC) effizienter gestaltet werden.

Für die Hybridisierungsreaktionen der PCR-Produkte an die Oligonukleotidsonden wurden die PCR-Amplifikate (1:2 mit Tris-EDTA, pH 8,0, verdünnt) nach einer 5-minütigen Denaturierung bei 96°C für eine Stunde bei 60°C mit den gekoppelten Beads inkubiert. In der Literatur lassen sich verschiedene Angaben zum Hybridisierungsvorgang finden. Grundsätzlich bestehen die veröffentlichten Protokolle aus einer 2-10 min Denaturierungsphase vor einer Hybridisierungsphase von 30-120 min (Armstrong et al. 2000, Deregt et al. 2006, Jiang et al. 2006, Letant et al. 2007, Oh et al. 2007, Rockenbauer et al. 2005, Taniuchi et al. 2011, Wallace et al. 2005). Lediglich Schmitt et al. verwendete ein Protokoll mit einer Hybridisierungsreaktion unter dauerhafter Agitation ohne vorangegangene Denaturierungsphase (Schmitt et al. 2006). Als Puffer in der Hybridisierungsreaktion wurde Tween 20 (Jiang et al. 2006), TMAC (Tetramethylammoniumchlorid) (Deregt et al. 2006)(Schmitt et al. 2006)(Wallace et al. 2005), FACS Flow (Spülflüssigkeit des FACS Canto™) (Horejsh et al. 2005), Etway Hybridsol und Triton X-100 (Oh et al. 2007), Tris NaCl (Letant et al. 2007) oder Phosphat Puffer (Rockenbauer et al. 2005) verwendet. Der qualitative Nachweis der Hybridisierung erfolgt durch die Bindung von SARPE (1µg/100µl) an die biotinylierten PCR-Produkte (Deregt et al. 2006, Greve et al. 2009, Hindson et al. 2008, Jiang et al. 2006, Letant et al. 2007, Oh et al. 2007, Schmitt et al. 2006, Wallace et al. 2005). Dieses Fluoreszenzsignal konnte im Anschluss am Durchflusszytometer gemessen werden.

Der qualitative Nachweis der Hybridisierungsreaktion wurde durch eine erfolgreiche Hybridisierung im Uniplex-System (s. Kap. 3.3.2, S.63) und im Multiplex-System (s. Kap.

3.3.3, S.65) für die acht afrikanischen HFV bestätigt. Die BP mit der spezifischen Sonde zeigte ein vielfach stärkeres Fluoreszenzsignal im Vergleich zu der BP mit der unspezifischen Sonde oder der BP mit der NK mit negativem Humanserum.

Im Anschluss an die Hybridisierungsreaktion erfolgte die Analyse der einzelnen Mixe (Mix 1-3) am FACS Canto™ II.

Dabei zeigten jeweils die Beads, an welche die spezifischen Sonden gekoppelt waren, ein deutlich höheres Signal als die Beads mit unspezifischen Sonden. Die MFI-PE-Werte der unspezifischen Sonden entsprachen denen der Negativkontrollen, bei denen negatives Humanserum anstelle von viraler RNS verwendet wurde. Auf diese Weise konnte bewiesen werden, dass lediglich die spezifischen Sonden eine Hybridisierung mit den PCR-Produkten eingingen.

Die absoluten Fluoreszenzwerte unterschieden sich meist deutlich im Inter-Assay-Vergleich, während die relativen Verhältnisse zwischen den spezifischen zu den unspezifischen Proben gleich blieben. Das bedeutete, dass die Fluoreszenzwerte jedes Versuchsdurchganges nur im Verhältnis zu den Ergebnissen der anderen Proben desselben Versuchsdurchganges analysiert werden können. Ein Vergleich der Fluoreszenzwerte zwischen verschiedenen Versuchsdurchgängen (Inter-Assay-Vergleich) war deshalb erschwert.

Beim Vergleich mit anderen veröffentlichten CBAs fiel auf, dass die Schwankungen dort meist geringer ausfielen, da mehr Versuchsdurchgänge ausgewertet wurden. Bei Lee et al. wurde zur Detektion von Viren, die Atemwegsinfektionen auslösen, der LOD z.B. anhand von 101 klinischen Proben (Rachenabstriche) evaluiert (Lee et al. 2007). In der statistischen Analyse fielen die Inter-Assay-Schwankungen aus diesem Grund nicht so ins Gewicht.

Auf Grund der Fluoreszenzunterschiede im Inter-Assay-Vergleich lassen sich in der Literatur keine absoluten Werte zur LOD-Definition finden. Meist wurde der LOD in Abhängigkeit von der NK des jeweiligen Versuchsdurchganges ermittelt (Horejsh et al. 2005, Lee et al. 2007, Oh et al. 2007, Schmitt et al. 2006, Wallace et al. 2005).

Zur Begründung dieser Inter-Assay-Schwankungen können verschiedene Erklärungen in Betracht gezogen werden. So ist das Fluoreszenzsignal abhängig von der Größe,

Sequenz, Sekundärstruktur und der Konzentration der PCR-Amplifikate. Besonders die Konzentration kann variieren, da sie ihrerseits abhängig ist von der Zuverlässigkeit der einzelnen PCR-Reaktionen. Eine regelmäßige Messung der Konzentration der PCR-Amplifikate könnte zum Ausschluss dieser Fehlerquelle führen.

Genauso könnten auch temperaturabhängige Messfehler bei der Analyse im Durchflusszytometer zu Schwankungen der MFI-PE-geführt haben. Unterschiedliche Kompensationen zur Korrektur der spektralen Überlappung für die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe können in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da alle Ergebnisse in der FACS-Diva-Software kompensationsunabhängig ausgewertet worden sind.

In einem weiteren Schritt sollte die analytische Sensitivität des Verfahrens im Uniplex-System ($n=3$) ermittelt werden und mit der Sensitivität im Multiplex-System ($n=1$) verglichen werden.

In diesem Fall wurden die PCR-Produkte von RNS-Standards bekannter Konzentrationen (10^1 - 10^7 Moleküle/ μl) an die gekoppelten Oligonukleotidsonden hybridisiert. Die Ergebnisse wurden im Anschluss am FACS Canto™ II gemessen und statistisch analysiert. Der Zusammenhang zwischen den unabhängigen Variablen wurde durch eine polynome Regressionsgerade definiert und in dem Bestimmtheitsmaß R^2 ausgedrückt. Je näher sich dabei das Bestimmtheitsmaß R^2 an 1 annäherte, desto eher ließ sich der Zusammenhang durch das polynome Regressionsmodell erklären.

Bei den HFV CCHFV, MARV, EBOVZ, EBOVS, YFV und DENV ergab sich ein $R^2 > 0,93$, womit sich ein polynomer Wertezusammenhang vermuten ließ. Nur bei RVFV fiel R^2 deutlich niedriger aus ($R^2=0,36$). Dies könnte durch eine frühe Sättigung der Oligonukleotidsonden erklärt werden. Schließlich wurden schon bei 10^2 Molekülen/ μl die Maximalwerte erreicht. Die Hybridisierung scheint hier derartig optimal zu sein und zur Sättigung zu führen, dass für eine Optimierung der Hybridisierung entweder das Angebot an Sonden erhöht oder an eine Vorverdünnung des PCR-Produktes gedacht werden muss (Abb. 3.19).

Der LOD wurde zur Definition positiver Ergebnisse bei der 6-fachen SD oberhalb des Hintergrundrauschens (Mittelwert der NK) festgelegt. Eine statistische Analyse der Ergebnisse im Uniplex-System mit dem Student-t-Test zeigte, dass eine statistische

Signifikanz (p -Wert $< 0,05$) bei den Viren RVFV, CCHFV, EBOV, YFV und DENV bis zu einer Konzentration von 10^1 Moleküle/ μ l und bei MARV bis zu 10^2 vorliegt (s. Tab. 3.5, S.78). Für LASV konnte keine statistische Analyse durchgeführt werden, da keine Hybridisierungen im Uniplex-System durchgeführt wurden.

Tab. 4.1: **Durchschnittliche Viruslast nach HFV-Infektion im Vergleich zur erreichten Sensitivität im Uniplex-Verfahren** des CBAs aus dieser Arbeit. Die aufgeführten Referenzwerte der durchschnittlichen Viruslast und die Sensitivität im CBA werden als Moleküle/ml angegeben.

Virus	Durchschnittliche Viruslast nach Infektion (Moleküle/ml)	Post-infektiöser Tag	Quelle	Sensitivität des CBA im Uniplex-System (Moleküle/ml)
RVFV	$8,6 \times 10^6$	<i>kA</i>	(Njenga et al. 2009)	1×10^4
CCHFV	1×10^6	6.Tag	(Wolfel et al. 2007)	1×10^4
MARV	$4,1 \times 10^4$	<i>kA</i>	(Weidmann et al. 2007)	1×10^7
EBOV	10^8 - 10^9	6.Tag	(Towner et al. 2004)	1×10^5
YFV	$2,4 \times 10^6$ - 3×10^7	<i>kA</i>	(Bae et al. 2005)	1×10^4
DENV	1×10^7	6.Tag	(Gurukumar et al. 2009)	1×10^4
LASV	1×10^6	6.Tag	(Schmitz et al. 2002)	<i>kA</i>

Die durchschnittliche Viruslast nach einer HFV-Infektion kann stark variieren, da sie abhängig von der Schwere der Erkrankung, der Analysemethode und vom Zeitpunkt der Probenentnahme ist (Saksida et al. 2010). Bei der Analyse der Viruslast eines HFV-Patienten muss folglich die Inkubationszeit berücksichtigt werden, da die Viruslast nach der Infektion zwar anfangs rapide steigt (virämische Phase), nach einigen Tagen allerdings wieder abfällt, zugunsten späterer Diagnostikparameter (Antikörper, Zytokine) (s. Abb. 1.7, S.17). Die in Tab. 4.1 aufgeführten Referenzwerte der durchschnittlichen Viruslast variieren von 10^4 – 10^9 Molekülen/ml. Während bei CCHFV, EBOV, DENV und LASV konkrete Angaben zum Entnahmezeitpunkt der Proben gemacht wurden (6. Postinfektiöser Tag), fehlen jegliche Angaben dieser Art zu RVFV, MARV und YFV. Ein direkter Vergleich dieser Proben ist deshalb nur begrenzt möglich. Dennoch wird deutlich, dass der in dieser Arbeit entwickelte CBA im Uniplex-System mit einer Sensitivität von 10^4 bzw. 10^5 Moleküle/ml mindestens zum 6. Postinfektiösen Tag für RVFV, CCHFV, EBOV, YFV, DENV ausreicht um eine zuverlässige Diagnostik bei einer HFV-

Infektion zu gewährleisten. Lediglich bei MARV liegt die durchschnittliche Viruslast unterhalb der signifikanten Sensitivität des CBA-Verfahrens.

Sowohl für EBOV als auch für CCHFV gilt eine Viruslast von 10^8 Moleküle/ml als klinisch relevanter Grenzwert, mit dem ein tödlicher Ausgang der Infektion bis zu 90% voraus gesagt werden kann (Saksida et al. 2010, Towner et al. 2004). Diese klinisch relevante Konzentration würde durch die Diagnostik mit dem CBA aus dieser Arbeit eindeutig erkannt werden.

Außerdem konnte mithilfe der statistischen Analyse bewiesen werden, dass der LOD eine eindeutige Trennung zum Hintergrundrauschen ermöglicht (Tab. 3.7, S.79). Dabei entsprachen die LOD-ermittelten sensitiven Konzentrationen weitestgehend den Konzentrationen, die auch durch den Student-t-Test als signifikant ($p < 0,05$) erkannt wurden. Bei EBOV lag der LOD bei einer Konzentration von 10^3 Molekülen/ μ l, obwohl bei dieser Konzentration noch keine statistische Signifikanz (p -Wert=0,087) bestand. Allerdings lag der p -Wert für die Fluoreszenzintensität von EBOV bei der nächsthöheren Konzentration (10^4 Molekülen/ μ l), bei der auch die MFI-PE-Signale der nächsthöheren log-Stufe erreicht wurden, mit p -Wert=0,009 wieder im signifikanten Bereich. Bei der statistischen Analyse der Ergebnisse von CCHFV konnte keine Signifikanz bis zur höchsten Konzentration (10^7 Moleküle/ μ l) bestätigt werden, obwohl aufgrund des LOD eine Sensitivität bis zu 10^1 Moleküle/ μ l vorliegen sollte. Dabei muss bedacht werden, dass die Ergebnisse der Hybridisierungsreaktion von CCHFV bisher unbefriedigend waren. Eine konzentrationsabhängige Steigerung der MFI-PE von CCHFV im Durchflusszytometer war nicht erkennbar, wohingegen die Auswertung der Multiplex-PCR auf dem Agarosegel eine erfolgreiche Amplifikation bewies. Aus diesem Grund muss der Assay für CCHFV verbessert werden. Eine Verbesserungsmöglichkeit besteht z.B. in der Herstellung neuer Sonden und Primer für CCHFV.

Im Multiplex-System ergaben sich für EBOVZ und EBOV vergleichbare Sensitivitäten wie im Uniplex-System, für CCHFV, YFV und DENV war der CBA weniger sensitiv und für MARV und RVFV sogar sensitiver als im Uniplex-System. Es scheint also einen Unterschied zu machen, ob eine Oligonukleotidsonde oder mehrere Oligonukleotidsonde während der Hybridisierung in der Probe enthalten sind. Zu

erwarten gewesen wäre eine vergleichbare Sensitivität. Dass sich die Fluoreszenzen zwischen dem Multiplex- und Uniplex-System unterscheiden, kann mehrere Gründe haben. Es ist denkbar, dass durch Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Oligonukleotidsonden die Ergebnisse im Multiplex-System beeinflusst wurden. Ebenso verschiebt sich im Multiplex-System das Verhältnis Beads/PCR-Amplifikate (Mix 1: 1/3-Verhältnis, Mix 2: 1/4-Verhältnis, Mix 3: 1/5-Verhältnis) durch die pipettierten anteiligen Volumina zugunsten der Beads, sodass eine Hybridisierung der PCR-Produkte an die spezifischen Sonden beeinflusst werden könnte.

Dennoch ist diese Verdünnung eher von geringfügiger Bedeutung und kann deswegen als Ursache ausgeschlossen werden. Eine mögliche Begründung für die verringerte Sensitivität könnte die vermehrte Kompetition der Oligonukleotidsonden untereinander sein. So könnten komplementäre Sequenzen der Sonden am 3'-Ende zu unspezifischen Hybridisierungen der Sonden miteinander geführt haben (z.B. in Mix 2: EBOVS-Sonde: 5'-...AAGG-3', DENV-Sonde: 5'-...GACC-3').

Allerdings weist die Tatsache, dass die MFI-PE-Werte teilweise in einer Konzentration von 10^5 Molekülen/ μl höher sind als bei 10^6 Molekülen/ μl vermutlich darauf hin, dass durchaus bereits eine Sättigung aller Oligonukleotidsonden erreicht wurde.

Aufgrund der geringen Versuchszahl der Multiplexhybridisierung ($n=1$) ist die Aussagekraft der Ergebnisse nur schwach. Für statistisch aussagekräftige Ergebnisse bei konkreteren Fragestellungen bezüglich der Fehlerquellen müssen weitere Versuche durchgeführt werden. Durch höhere Versuchszahl könnten Werteschwankungen, z.B. Inter-Assay-Schwankungen der Fluoreszenzsignale in der Uniplex- und Multiplex-Hybridisierung minimiert werden. Im Vergleich dazu finden sich in der Literatur wesentlich größere Versuchszahlen im CBA mit Patientenproben: 190-319 Proben (Taniuchi et al. 2011), 103 Proben (Lee et al. 2007), 132 Proben (Oh et al. 2007), 133 Proben (Jiang et al. 2006). Eine Testung mit HFV-Patientenproben wäre schwierig, da HFV-positive Patientenproben eine Rarität sind.

Um das Potential des CBA als Diagnostikverfahren in der Routinediagnostik einschätzen zu können, wurde die Sensitivität des Verfahrens im Uniplexsystem mit der Sensitivität einer qRT-PCR verglichen, in der die gleichen Primern verwendet worden sind.

Dabei stellte sich heraus, dass die Uniplex-Hybridisierungsreaktion eine ähnliche Sensitivität wie die qRT-PCR aufwies. Für YFV und DENV waren die Ergebnisse im CBA sogar besser als in der qRT-PCR. Ein Vergleich mit CCHFV bleibt kritisch, da bei der Uniplex-Hybridisierung von CCHFV in der Grenzwertermittlung eine NK-Probe nicht berücksichtigt werden konnte und aus diesem Grund die SD nur sehr niedrig gewesen sind (s. Kap. 3.3.6, S.76).

Auch Taniuchi et al. führte einen Vergleich seines CBAs für sieben intestinale Parasiten (Taniuchi et al. 2011) mit den Ct-Werten aus qRT-PCR mit denselben Primern durch. Dabei wies der CBA bessere oder gleich gute Ergebnisse wie die qRT-PCR auf. Dennoch fiel auf, dass der Zusammenhang zwischen der Parasitenquantität und Ct-Werten aus der qRT-PCR linearer war, als der Zusammenhang zwischen der Parasitenquantität und der Fluoreszenzsignalen im CBA.

Obwohl die analytischen Sensitivitäten im CBA-Multiplex-System geringer waren als im CBA-Uniplex-System, waren sie dennoch mit den analytischen Sensitivitäten der qRT-PCR-Verfahren vergleichbar. Die ermittelte Sensitivität des Multiplex-Hybridisierungsverfahren von RVFV, MARV, EBOVZ und YFV entsprach genau der Sensitivität in der qRT-PCR, die Sensitivität von EBOVS und DENV war jeweils nur eine 10er-Potenz schwächer als in der qRT-PCR und nur bei CCHFV nahm die Sensitivität im Multiplex-CBA um zwei 10er-Potenzen im Vergleich zur qRT-PCR ab.

Dabei sollte jedoch weiterhin bedacht werden, dass die verlängerte Hybridisierungsdauer im Multiplex-CBA (TaqMan-PCR: max. 1 min. und Multiplex-CBA: 1 Std.) zu einem erhöhten Risiko für Kreuzreaktivitäten führen kann.

Zur Untersuchung von Kreuzreaktivitäten zwischen den Oligonukleotidsonden und den PCR-Produkten aus Mix 1 und Mix 2 wurden die bead-gekoppelten Oligonukleotidsonden jeweils mit PCR-Produkten aus beiden Mixen für eine Stunde bei 60°C inkubiert.

Dabei waren die Fluoreszenzsignale der Oligonukleotidsonde mit dem spezifischen PCR-Amplifikat deutlich höher als die Fluoreszenzsignale der Sonden mit unspezifischen PCR-Produkten, die den gemessenen Ergebnissen von NK ähnelten. Kreuzreaktivitäten wurden allgemein im CBA nicht beobachtet außer bei der EBOVZ-Sonde. Dort kam es zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität bei der Zugabe von EBOVS-PCR-

Amplifikaten. Die MFI-PE der EBOVZ-Sonde und dem EBOVS-Amplifikat war immerhin 0,3-fach so hoch wie die MFI-PE der spezifischen EBOVS-Sonde. Die Ursache könnte möglicherweise eine Kreuzreaktionen zwischen der EBOVZ-Sonde und dem EBOVS-PCR-Amplifikat sein, die auf eine ähnliche Sequenz der eng verwandten Viren zurückgeführt werden kann. Bei der Analyse mit der „MegAlign-Software“ fiel auf, dass die Amplikons von EBOVZ und EBOVS zu 55,8% identisch waren. Zum MARV-Amplikon z.B. gab es jeweils lediglich 33,3%ige (EBOVS) bzw. 36,4%ige (EBOVZ) Übereinstimmung. Die Daten der übrigen Sonden in der vorliegenden Arbeit demonstrierten eine gute Spezifität des CBAs und bewiesen, dass keine unspezifischen Bindungen an die Oligonukleotidsonden stattgefunden haben.

Kreuzreaktionen in Multiplex-CBAs sind bekannt. Taniuchi et al. lösten das Problem, indem sie den CBA für sieben intestinale Parasiten in zwei Versuchsreihen aufteilten: eine Versuchsreihe für Protozoen und eine Versuchsreihe für Helminthen (Taniuchi et al. 2011). Bei der Detektion von Humanen Papillomaviren (HPV) mittels Multiplex-CBA fielen ebenfalls Kreuzreaktionen zwischen einigen HPV auf, die zur Verringerung der Fluoreszenzintensität führten (Oh et al. 2007, Wallace et al. 2005). Diese Problematik konnte durch Herabsetzen des Detektionsgrenzwertes (Oh et al. 2007) oder durch das Herausselektieren einiger HPV aus der Versuchsreihe umgangen werden (Wallace et al. 2005).

Dennoch ist der CBA, der in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde, eine mögliche Alternative zur quantitativen Real-Time-PCR, dem bisher meist verwendeten Diagnostikverfahren für HFV.

4.1 Ausblick

Der in dieser Arbeit entwickelte CBA zur Detektion von acht afrikanischen HFV bietet eine gute Alternative zu bisher verwendeten Diagnostikverfahren (z.B. qRt-PCR).

Dennoch gibt es weitere Möglichkeiten den CBA zu optimieren wie die Verbesserungsansätze in Kap. 3.3.1 (S.60) zeigen: (1) Durch eine Lagerung der gekoppelten Beads bei -20°C ü.N. konnten die Fluoreszenzintensitäten der Hybridisierungsergebnisse von MFI-PE: 50913 erreicht werden, die um den 3,5-fachen Wert höher waren als die Fluoreszenzintensitäten der Beads, die direkt nach Kopplungsreaktion zur Hybridisierung verwendet wurden (MFI-PE: 14654). (2) Die Spezifität der Fluoreszenzsignale konnte durch Verwenden eines Blockpuffers (z.B. BSA, SM) verbessert werden (s. Kap. 3.3.1.3, S.62). (3) Eine optimale Hybridisierungstemperatur zu ermitteln war ein notwendiger Schritt um einen CBA im Multiplex-System zu ermöglichen. Dabei musste berücksichtigt werden, dass die Hybridisierungstemperatur unterhalb der jeweiligen Schmelztemperatur T_{MS} der einzelnen Sonden lag und dennoch hoch genug war, um unspezifische Hybridisierungen zu verhindern.

Weitere Möglichkeiten zur Verbesserung des CBAs wären die Zugabe von apolarem Formamid oder DMSO. In dieser Arbeit ist darauf jedoch verzichtet worden um das Verfahren nicht zu kompliziert zu machen.

Durch den hohen Verbrauch an Beads ($1,25 \times 10^5$ Beads/Probe d.h. $5\mu\text{l}$) waren die Kosten ($1,85\text{€}/5\mu\text{l}$) eines Multiplex-CBAs zu hoch verglichen mit anderen etablierten Verfahren wie z.B. qRT-PCR. Um den in dieser Arbeit entwickelten CBA in afrikanischen Laboren (z.B. *Institute Pasteur de Dakar*, Senegal) zu etablieren, müssen die Kosten zur Anwendung in der Routinediagnostik noch gesenkt werden. Eine Möglichkeit liegt in der Reduzierung der Beadkonzentration. Laut Hersteller (Biorad) kann eine statistisch relevante Evaluation schon mit 35 Beads/Probe erreicht werden. Dies gilt zumindest für das Bioplex-System von Biorad. Es sollte kritisch untersucht werden, ob es sich auf den CBA, bei dem bisher jeweils 1000 Beads/Probe ausgewertet wurden, übertragen lässt. Es müsste dabei die Effizienz der Hybridisierungsreaktion neu überprüft werden, da das

veränderte Verhältnis der Beads zu den PCR-Produkten zur Abschwächung der Fluoreszenzsignale im Durchflusszytometer führen könnte. Es könnte dabei auch überlegt werden, ob nicht auch durch Umstellung auf ein anderes System, bzw. anderes Material, die Kosten gesenkt werden könnten. So könnte z.B. durch die Verwendung von magnetischen Beads der Beadverlust durch die Waschschrirte minimiert werden und Kosten gesenkt werden.

Dennoch bleibt der Multiplex-CBA der qRT-PCR in einigen Punkten überlegen. Schließlich wird durch die kombinierte Detektion von Virusgenomen, Zytokinen und AK das gesamte diagnostische Fenster abgedeckt und die gesamte molekulare Diagnostik von acht afrikanischen HFV auf ein gemeinsames Verfahren beschränkt.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung eines nukleinsäure-basierenden *Cytometric Bead Array* (CBA) zum Nachweis von hämorrhagischen Fiebereviren. Um den CBA entwickeln zu können, wurden spezifische PCR-Amplifikate für acht hämorrhagischen Fiebereviren (HFV) an bead-gekoppelte Oligonukleotidsonden hybridisiert. Bei den acht HFV handelte es sich um Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV), Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV), Marburg-Virus (MARV), Ebola-Zaire-Virus (EBOVZ), Ebola-Sudan-Virus (EBOVS), Gelbfieber-Virus (YFV), Dengue-Virus (DENV) und Lassa-Virus (LASV).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Multiplex-RT-PCRs für die ausgewählten Sequenzen der acht HFV entwickelt und in der qRT-PCR aufeinander abgestimmt. Die Oligonukleotidsonden wurden mithilfe von 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDAC) an die carboxylierten Beads gekoppelt. Durch diese Oligonukleotidsonden konnten die spezifischen PCR-Amplifikate aus den Multiplex-RT-PCRs an die Beads hybridisiert werden. Mit Hilfe von RNS-Standards bekannter Konzentrationen konnte die analytische Sensitivität der bead-gekoppelten Sonden ermittelt werden. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer (FACS CantoTM II). Die Spezifität der Oligonukleotidsonden konnte durch Abwesenheit von Kreuzreaktionen im Multiplex-Hybridisierungsverfahren bewiesen werden. Die Sensitivitäten des *Cytometric Bead Array* sind mit den Sensitivitäten einer qRT-PCR, dem meist verwendeten Verfahren zur HFV-Diagnostik, vergleichbar. Damit ist in der vorliegenden Arbeit ein Diagnostikverfahren entwickelt worden, das eine Alternative zur Routinediagnostik von HFV bietet.

6 Literaturverzeichnis

- Altamura LA, Bertolotti-Ciarlet A, Teigler J, Paragas J, Schmaljohn CS, Doms RW. (2007): Identification of a novel C-terminal cleavage of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus PreGN that leads to generation of an NSM protein *J Virol*; **81**(12):6632-6642.
- Armstrong B, Stewart M, Mazumder A. (2000): Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping *Cytometry*; **40**(2):102-108.
- Auperin DD, McCormick JB. (1989): Nucleotide sequence of the Lassa virus (Josiah strain) S genome RNA and amino acid sequence comparison of the N and GPC proteins to other arenaviruses *Virology*; **168**(2):421-425.
- Bae HG, Drosten C, Emmerich P, Colebunders R, Hantson P, Pest S, Parent M, Schmitz H, Warnat MA, Niedrig M. (2005): Analysis of two imported cases of yellow fever infection from Ivory Coast and The Gambia to Germany and Belgium *J Clin Virol*; **33**(4):274-280.
- Bardi JS: Death Called A River, The Scripps Research Institute 2.1, Retrieved 2006-12-08, La Jolla 2002
- Barrett AD, Higgs S. (2007): Yellow fever: a disease that has yet to be conquered *Annu Rev Entomol*; **52**:209-229.
- Baskerville A, Satti A, Murphy FA, Simpson DI. (1981): Congo-Crimean haemorrhagic fever in Dubai: histopathological studies *J Clin Pathol*; **34**(8):871-874.
- BD: Fluorescence Spectrum Viewer, BD Bioscience, New Jersey 2011, http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp
- Bean WB. (1983): Landmark perspective: Walter Reed and yellow fever *JAMA*; **250**(5):659-662.
- Bellisario R, Colinas RJ, Pass KA. (2001): Simultaneous measurement of antibodies to three HIV-1 antigens in newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed microsphere-based immunoassay *Early Hum Dev*; **64**(1):21-25.
- Blakqori G, Delhaye S, Habjan M, Blair CD, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Attarzadeh-Yazdi G, Fragkoudis R, Kohl A, Kalinke U, et al. (2007): La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts *J Virol*; **81**(10):4991-4999.
- Borio L, Inglesby T, Peters CJ, Schmaljohn AL, Hughes JM, Jahrling PB, Ksiazek T, Johnson KM, Meyerhoff A, O'Toole T, et al. (2002): Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management *JAMA*; **287**(18):2391-2405.
- Bray M, Huggins JW. (1998): Antiviral therapy of haemorrhagic fevers and arbovirus infections *Antiviral Ther*; **3**:53-79.
- Bray M, Paragas J. (2002): Experimental therapy of filovirus infections *Antiviral Res*; **54**(1):1-17.
- Broude NE, Zhang L, Woodward K, Englert D, Cantor CR. (2001): Multiplex allele-specific target amplification based on PCR suppression *Proc Natl Acad Sci U S A*; **98**(1):206-211.
- Buckley SM, Casals J. (1970): Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus *Am J Trop Med Hyg*; **19**(4):680-691.
- Burger K, Friis E, Hubner R, Janisch K, Schimmelpfennig W, Schneider G, Theuer D, Wagner K, Zimmermann HB. (1971): [Surgical treatment of portal hypertension:

- indications for prophylactic emergency and interval-shunt] *Dtsch Gesundheitswes*;26(13):586-590.
- Burney MI, Ghafoor A, Saleen M, Webb PA, Casals J. (1980): Nosocomial outbreak of viral hemorrhagic fever caused by Crimean Hemorrhagic fever-Congo virus in Pakistan, January 1976 *Am J Trop Med Hyg*;29(5):941-947.
- Carhan A, Uyar Y, Ozkaya E, Ertek M, Dobler G, Dilcher M, Wang YJ, Spiegel M, Hufert F, Weidmann M. (2010): Characterization of a sandfly fever Sicilian virus isolated during a sandfly fever epidemic in Turkey *J Clin Virol*;48(4):264-269.
- Carson RT, Vignali DA. (1999): Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay *J Immunol Methods*;227(1-2):41-52.
- Casals J. (1969): Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus *Proc Soc Exp Biol Med*;131(1):233-236.
- CDC: Yellow Fever in Brazil, Outbreak Notice, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta 2010, <http://wwwnc.cdc.gov/travel/notices/outbreak-notice/yellow-fever-brazil.htm>
- CDC: Outbreak postings, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta 2011, <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/outbreaks/index.htm>
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. (1990): Flavivirus genome organization, expression, and replication *Annu Rev Microbiol*;44:649-688.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal Biochem*;162(1):156-159.
- Clegg JC, Wilson SM, Oram JD. (1991): Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arenavirus gene products *Virus Res*;18(2-3):151-164.
- Corso B, Pinto J, Beltrain-Alcrudo D, De Simone L, Lubroth J: Rift Valley fever outbreaks in Madagascar and potential risks to neighbouring countries, FAO EMPRES Watch., Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy 2008, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/aj213e/aj213e00.pdf>
- Dasso J, Lee J, Bach H, Mage RG. (2002): A comparison of ELISA and flow microsphere-based assays for quantification of immunoglobulins *J Immunol Methods*;263(1-2):23-33.
- Daubney R, Hudson JR, Garnham PC. (1931): Enzootic hepatitis of RVF, an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from east africa *J Pathol* 34:545-579.
- Davies FG. (2006): Risk of a rift valley fever epidemic at the haj in Mecca, Saudi Arabia *Rev Sci Tech*;25(1):137-147.
- Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS. (1994): Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR *J Clin Microbiol*;32(12):2898-2903.
- Deregt D, Gilbert SA, Dudas S, Pasick J, Baxi S, Burton KM, Baxi MK. (2006): A multiplex DNA suspension microarray for simultaneous detection and differentiation of classical swine fever virus and other pestiviruses *J Virol Methods*;136(1-2):17-23.
- Digoutte JP, Calvo-Wilson MA, Mondo M, Traore-Lamizana M, Adam F. (1992): Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection *Res Virol*;143(6):417-422.
- Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Gunther S. (2002a): Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR *J Clin Microbiol*;40(7):2323-2330.

- Drosten C, Minnak D, Emmerich P, Schmitz H, Reinicke T. (2002b): Crimean-Congo hemorrhagic fever in Kosovo *J Clin Microbiol*;40(3):1122-1123.
- Dunster L, Dunster M, Ofula V, Beti D, Kazooba-Voskamp F, Burt F, Swanepoel R, DeCock KM. (2002): First documentation of human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Kenya *Emerg Infect Dis*;8(9):1005-1006.
- el-Azazy OM, Scrimgeour EM. (1997): Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in the western province of Saudi Arabia *Trans R Soc Trop Med Hyg*;91(3):275-278.
- EMA: CPMP guidance document on use of medicinal products for treatment and prophylaxis of biological agents that might be used as weapons of bioterrorism, EMA London 2002, www.emea.eu.int
- Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA. (2002): Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand *Am J Epidemiol*;156(1):40-51.
- Ergonul O. (2006): Crimean-Congo haemorrhagic fever *Lancet Infect Dis*;6(4):203-214.
- Expaty: ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva 2011, <http://viralzone.expasy.org/>
- Fan J, MS C, Gunderson K. (2006): Highly parallel genomic assays *Nature Review Genetics*;7:632-644.
- Fauquet CM, Fargette D. (2005): International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species *Virology*;2:64.
- Formenty P, Hatz C, Le Guenno B, Stoll A, Rogenmoser P, Widmer A. (1999): Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation *J Infect Dis*;179 Suppl 1:S48-53.
- Frame JD, Baldwin JM, Jr., Gocke DJ, Troup JM. (1970): Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings *Am J Trop Med Hyg*;19(4):670-676.
- Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM, McClain DJ, Hoover DL, Bryne WR, Pavlin JA, Christopher GW, Eitzen EM, Jr. (1997): Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents *JAMA*;278(5):399-411.
- Freedman DO, Weld LH, Kozarsky PE, Fisk T, Robins R, von Sonnenburg F, Keystone JS, Pandey P, Cetron MS. (2006): Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers *N Engl J Med*;354(2):119-130.
- Fuller F, Bhowan AS, Bishop DH. (1983): Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NSS, are coded by overlapping reading frames in the S RNA *J Gen Virol*;64 (Pt 8):1705-1714.
- Gardner, Boilot P, Hines EL. Enhancing electronic nose performance by sensor selection using a new integer-based genetic algorithm approach. In: *Selected Papers from the 10th International Symposium on Olfaction and Electronic Noses*, Electrical and Electronic Engineering Division, School of Engineering, University of Warwick, Coventry, UK. 2004:114-121.
- Gear JS, Cassel GA, Gear AJ, Trappler B, Clausen L, Meyers AM, Kew MC, Bothwell TH, Sher R, Miller GB, et al. (1975): Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg *Br Med J*;1975,4(5995):489-493.
- Geisbert TW, Geisbert JB, Leung A, Daddario-DiCaprio KM, Hensley LE, Grolla A, Feldmann H. (2009): Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of ebola virus *J Virol*;83(14):7296-7304.

- Geisbert TW, Lee ACH, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, Johnson JC, de Jong S, Tavakoli I, Judge A, et al. (2010): Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study *Lancet*;375(9729):1896-1905.
- Giorgi C, Accardi L, Nicoletti L, Gro MC, Takehara K, Hilditch C, Morikawa S, Bishop DH. (1991): Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses *Virology*;180(2):738-753.
- GlobalIncidentMap.com: Lassa Outbreaks, Steadfast Networks, Chicago 2011, <http://outbreaks.globalincidentmap.com/home.php>
- Goehde W, Dittrich W. (1971): Impulszytometrie bei Einzelzellen in Suspension *Z Naturforsch*;B24.
- Greve B, Weidner J, Cassens U, Odaibo G, Olaleye D, Sibrowski W, Reichelt D, Nasdala I, Gohde W. (2009): A new affordable flow cytometry based method to measure HIV-1 viral load *Cytometry A*;75(3):199-206.
- Gunther S, Emmerich P, Laue T, Kuhle O, Asper M, Jung A, Grewing T, ter Meulen J, Schmitz H. (2000): Imported Lassa fever in Germany: Molecular characterization of a new Lassa virus strain *Emerg Infect Dis*;6(5):466-476.
- Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, Cecilia D. (2009): Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses *Virology*;6:10.
- Halstead SB. (1988): Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology *Science*;239(4839):476-481.
- Halstead SB. (2007): Dengue *Lancet*;370(9599):1644-1652.
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. (1974): Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis *J Virol*;14(5):1235-1244.
- Hindson BJ, Reid SM, Baker BR, Ebert K, Ferris NP, Tammero LF, Lenhoff RJ, Naraghi-Arani P, Vitalis EA, Slezak TR, et al. (2008): Diagnostic evaluation of multiplexed reverse transcription-PCR microsphere array assay for detection of foot-and-mouth and look-alike disease viruses *J Clin Microbiol*;46(3):1081-1089.
- Holmes GP, McCormick JB, Trock SC, Chase RA, Lewis SM, Mason CA, Hall PA, Brammer LS, Perez-Oronoz GI, McDonnell MK, et al. (1990): Lassa fever in the United States. Investigation of a case and new guidelines for management *N Engl J Med*;323(16):1120-1123.
- Horejsh D, Martini F, Poccia F, Ippolito G, Di Caro A, Capobianchi MR. (2005): A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry *Nucleic Acids Res*;33(2):e13.
- Hunter P, Bouloy M: Investigation of C13 RVF mutant as a vaccine strain, University of Pretoria, Stellenbosch/ South Africa 2001
- Jahrling P, Hesse R, Eddy G, Johnson K, Callis R, Stephen E. (1980): Lassa virus infection of rhesus monkeys: pathogenesis and treatment with ribavirin *J Infect Dis*;141(5):580-589.
- Jahrling P: Viral hemorrhagic fevers, Office of the Surgeon General, Falls Church 1989
- Jiang HL, Zhu HH, Zhou LF, Chen F, Chen Z. (2006): Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system *J Med Microbiol*;55(Pt 6):715-720.
- Kabra SK, Jain Y, Singhal T, Ratageri VH. (1999): Dengue hemorrhagic fever: clinical manifestations and management *Indian J Pediatr*;66(1):93-101.

- Kuo KW, Leung MF, Leung WC. (1997): Intrinsic secondary structure of human TNFR-I mRNA influences the determination of gene expression by RT-PCR *Mol Cell Biochem*;177(1-2):1-6.
- Lee WM, Grindle K, Pappas T, Marshall DJ, Moser MJ, Beaty EL, Shult PA, Prudent JR, Gern JE. (2007): High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses *J Clin Microbiol*;45(8):2626-2634.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, Ramos C, Rico-Hesse R. (1999): Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis *J Virol*;73(6):4738-4747.
- Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Delicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R. (2005): Fruit bats as reservoirs of Ebola virus *Nature*;438(7068):575-576.
- Leroy EM, Epelboin A, Mondonge V, Pourrut X, Gonzalez JP, Muyembe-Tamfum JJ, Formenty P. (2009): Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007 *Vector Borne Zoonotic Dis*;9(6):723-728.
- Letant SE, Ortiz JI, Bentley Tammero LF, Birch JM, Derlet RW, Cohen S, Manning D, McBride MT. (2007): Multiplexed reverse transcriptase PCR assay for identification of viral respiratory pathogens at the point of care *J Clin Microbiol*;45(11):3498-3505.
- Mackerras IM. (1946): Transmission of dengue fever by *Aedes (Stegomyia) scutellaris* Walk. in New Guinea *Trans R Soc Trop Med Hyg*;40(3):295-312.
- McBride JH. (1999): Dengue fever. An Australian perspective *Aust Fam Physician*;28(4):319-323.
- McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, Johnson KM, Smith ES. (1987): A Prospective-Study of the Epidemiology and Ecology of Lassa Fever *J Infect Dis*;155(3):437-444.
- McCormick JB, Fisher-Hoch S, Horvitz LA: Level 4: Virus Hunters of the CDC, Barnes & Noble, New York 1999
- Mertens PE, Patton R, Baum JJ, Monath TP. (1973): Clinical presentation of Lassa fever cases during the hospital epidemic at Zorzor, Liberia, March-April 1972 *Am J Trop Med Hyg*;22(6):780-784.
- Modrow S, Dietrich F, Truyen U: Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2003
- Molekulare Virologie Heidelberg: The Department for Infectious Diseases, Universität Heidelberg, Heidelberg 2010, <http://molecular-virology.uni-hd.de>
- Monath TP, Mertens PE, Patton R, Moser CR, Baum JJ, Pinneo L, Gary GW, Kissling RE. (1973): A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March-April 1972 *Am J Trop Med Hyg*;22(6):773-779.
- Monath TP. (2001): Yellow fever: an update *Lancet Infect Dis*;1(1):11-20.
- Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, Dreier T, Turell M, Smith J, Bouloy M. (1995): Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment *Am J Trop Med Hyg*;53(4):405-411.
- Mullis KB, Faloona FA. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction *Methods Enzymol*;155:335-350.
- Myers TW, Gelfand DH. (1991): Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase *Biochemistry*;30(31):7661-7666.

- Nabeth P, Cheikh DO, Lo B, Faye O, Vall IO, Niang M, Wague B, Diop D, Diallo M, Diallo B, et al. (2004a): Crimean-Congo hemorrhagic fever, Mauritania *Emerg Infect Dis*;10(12):2143-2149.
- Nabeth P, Thior M, Faye O, Simon F. (2004b): Human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Senegal *Emerg Infect Dis*;10(10):1881-1882.
- NCBI: GenBank, National Center for Biotechnology Information, Bethesda 2011a, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=gene%20bank>
- NCBI: BLAST, National Center for Biotechnology Information, Bethesda 2011b, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
- Negredo A, Palacios G, Vázquez-Morón S, González F, Dopazo H, Molero F. (2011): Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe *PLoS Pathogens*;7(10):e1002304.
- NICD: Rift Valley Fever Interim Report, South Africa, National Institute of Communicable Diseases, Johannesburg 2010, www.nicd.ac.za/assets/files/NICD%20Communique%20October%202010.pdf
- NICD: Interim Report on the 2011 Rift Valley Fever Outbreak in South Africa, National Institute for Communicable Diseases, Johannesburg 2011, <http://www.sacids.org/kms/resources/RVF%20Interim%20Report%20-%2020110510.pdf>
- NIH: Accelerated and Development of Vaccines, The Jordan Report. 20th Anniversary , US Department of Health and Human Services Bethesda 2002
- Njenga MK, Paweska J, Wanjala R, Rao CY, Weiner M, Omballa V, Luman ET, Mutonga D, Sharif S, Panning M, et al. (2009): Using a field quantitative real-time PCR test to rapidly identify highly viremic rift valley fever cases *J Clin Microbiol*;47(4):1166-1171.
- Ogbu O, Ajuluchukwu E, Uneke CJ. (2007): Lassa fever in West African sub-region: an overview *J Vector Borne Dis*;44(1):1-11.
- Oh Y, Bae SM, Kim YW, Choi HS, Nam GH, Han SJ, Park CH, Cho Y, Han BD, Ahn WS. (2007): Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types *Cancer Sci*;98(4):549-554.
- Palacios G, Briese T, Kapoor V, Jabado O, Liu Z, Venter M, Zhai J, Renwick N, Grolla A, Geisbert TW, et al. (2006): MasTag polymerase chain reaction for differential diagnosis of viral hemorrhagic fever *Emerg Infect Dis*;12(4):692-695.
- Panomics: Luminex Technology Overview, Affimetrix Inc., Santa Clara 2011, <http://www.panomics.com>
- Papa A, Bino S, Llagami A, Brahimaj B, Papadimitriou E, Pavlidou V, Velo E, Cahani G, Hajdini M, Pilaca A, et al. (2002a): Crimean-Congo hemorrhagic fever in Albania, 2001 *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;21(8):603-606.
- Papa A, Ma B, Kouidou S, Tang Q, Hang C, Antoniadis A. (2002b): Genetic characterization of the M RNA segment of Crimean Congo hemorrhagic fever virus strains, China *Emerg Infect Dis*;8(1):50-53.
- Papa A, Christova I, Papadimitriou E, Antoniadis A. (2004): Crimean-Congo hemorrhagic fever in Bulgaria *Emerg Infect Dis*;10(8):1465-1467.
- Peters CJ, Reynolds JA, Slone TW, Jones DE, Stephen EL. (1986): Prophylaxis of Rift Valley fever with antiviral drugs, immune serum, an interferon inducer, and a macrophage activator *Antiviral Res*;6(5):285-297.
- Pierson TC, Diamond MS. (2008): Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection *Expert Rev Mol Med*;10:e12.

- Pollitt E, Zhao J, Muscat P, Elliott RM. (2006): Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture *Virology*; 348(1):224-232.
- QIAGEN: MinElute Purification Kit, Hilden 2010,
<http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrscleanupsystems/minelutepcrpurificationkit.aspx>
- Richards GA, Murphy S, Jobson R, Mer M, Zinman C, Taylor R, Swanepoel R, Duse A, Sharp G, De La Rey IC, et al. (2000): Unexpected Ebola virus in a tertiary setting: clinical and epidemiologic aspects *Crit Care Med*; 28(1):240-244.
- Rockenbauer E, Petersen K, Vogel U, Bolund L, Kolvraa S, Nielsen KV, Nexø BA. (2005): SNP genotyping using microsphere-linked PNA and flow cytometric detection *Cytometry A*; 64(2):80-86.
- Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. (1954): The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks *Am J Trop Med Hyg*; 3(5):878-882.
- Saksida A, Duh D, Wraber B, Dedushaj I, Ahmeti S, Avsic-Zupanc T. (2010): Interacting roles of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever *Clin Vaccine Immunol*; 17(7):1086-1093.
- Saluzzo JF, Le Guenno B. (1987): Rapid diagnosis of human Crimean-Congo hemorrhagic fever and detection of the virus in naturally infected ticks *J Clin Microbiol*; 25(5):922-924.
- Sambrook J, E.F. Fritsch and T. Maniatis: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989
- Sanchez IJ, Ruiz BH. (1996): A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice *J Gen Virol*; 77 (Pt 10):2541-2545.
- Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. (2006): Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses *J Clin Microbiol*; 44(2):504-512.
- Schmitz H, Kohler B, Laue T, Drosten C, Veldkamp PJ, Gunther S, Emmerich P, Geisen HP, Fleischer K, Beersma MF, et al. (2002): Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever *Microbes Infect*; 4(1):43-50.
- Schwarz TF, Nsanze H, Ameen AM. (1997): Clinical features of Crimean-Congo haemorrhagic fever in the United Arab Emirates *Infection*; 25(6):364-367.
- Seiler NF. Inkubationszeit und Übertragungsparameter der Ebolaviruskrankheit, Med. Diss. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2008.
- Sheikh AS, Sheikh AA, Sheikh NS, Rafi US, Asif M, Afridi F, Malik MT. (2005): Bi-annual surge of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF): a five-year experience *Int J Infect Dis*; 9(1):37-42.
- Shu PY, Huang JH. (2004): Current advances in dengue diagnosis *Clin Diagn Lab Immunol*; 11(4):642-650.
- Slenczka WG. (1999): The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes *Curr Top Microbiol Immunol*; 235:49-75.
- Smith DH, Johnson BK, Isaacson M, Swanapoel R, Johnson KM, Killey M, Bagshawe A, Siongok T, Keruga WK. (1982): Marburg-virus disease in Kenya *Lancet*; 1982,1(8276):816-820.
- Sudiro TM, Zivny J, Ishiko H, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nisalak A, Norman JE, Ennis FA, Rothman AL. (2001): Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction *J Med Virol*; 63(1):29-34.

- Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA, Shepherd SP. (1985): Investigations following initial recognition of Crimean-Congo haemorrhagic fever in South Africa and the diagnosis of 2 further cases *S Afr Med J*; 68(9):638-641.
- Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, Harvey S. (1989): The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever *Rev Infect Dis*; 11 Suppl 4:S794-800.
- Swanepoel R, Leman PA, Burt FJ, Zachariades NA, Braack LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Peters CJ. (1996): Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus *Emerg Infect Dis*; 2(4):321-325.
- Swanepoel R, Smit SB, Rollin PE, Formenty P, Leman PA, Kemp A, Burt FJ, Grobbelaar AA, Croft J, Bausch DG, et al. (2007): Studies of reservoir hosts for Marburg virus *Emerg Infect Dis*; 13(12):1847-1851.
- Syvanen AC. (2005): Toward genome-wide SNP genotyping *Nat Genet*; 37 Suppl:S5-10.
- Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout L, Petri WA, Jr., Haque R, Houpt ER. (2011): High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites *Am J Trop Med Hyg*; 84(2):332-337.
- Ter Meulen J, Koulemou K, Wittekint T, Windisch K, Strigl S, Conde S, Schmitz H. (1998): Detection of Lassa virus antinucleoprotein immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies by a simple recombinant immunoblot assay for field use *J Clin Microbiol*; 36(11):3143-3148.
- Timen A, Koopmans MP, Vossen AC, van Doornum GJ, Gunther S, van den Berkmoortel F, Verduin KM, Dittrich S, Emmerich P, Osterhaus AD, et al. (2009): Response to imported case of Marburg hemorrhagic fever, the Netherland *Emerg Infect Dis*; 15(8):1171-1175.
- Towner JS, Rollin PE, Bausch DG, Sanchez A, Crary SM, Vincent M, Lee WF, Spiropoulou CF, Ksiazek TG, Lukwiya M, et al. (2004): Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome *J Virol*; 78(8):4330-4341.
- Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albarino CG, Conlan S, Reeder SA, Quan PL, Lipkin WI, Downing R, Tappero JW, et al. (2008): Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda *PLoS Pathog*; 4(11):e1000212.
- Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Carroll SA, Comer JA, Kemp A, Swanepoel R, Paddock CD, Balinandi S, Khristova ML, et al. (2009): Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats *PLoS Pathog*; 5(7):e1000536.
- Tsai CJ, Kuo CH, Chen PC, Changcheng CS. (1991): Upper gastrointestinal bleeding in dengue fever *Am J Gastroenterol*; 86(1):33-35.
- Tsai TF, Vaughn D, Solomon T: Yellow fever, Dengue, Dengue hemorrhagic fever, Japanese encephalitis, West Nile encephalitis, St Louis encephalitis, tick-borne encephalitis, 6th ed, Elsevier Philadelphia 2005
- van de Wal BW, Joubert JR, van Eeden PJ, King JB. (1985): A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part IV. Preventive and prophylactic measures *S Afr Med J*; 68(10):729-732.
- van Eeden PJ, van Eeden SF, Joubert JR, King JB, van de Wal BW, Michell WL. (1985): A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part II. Management of patients *S Afr Med J*; 68(10):718-721.
- Volk D: Reaction scheme of carboxylic acid amine coupling mediated by a carbodiimide and NHS Citizendum, USA 2009,
http://en.citizendum.org/wiki/File:Carbodiimide_coupling_via_NHS_ester.png

- Wagner D, de With K, Huzly D, Hufert F, Weidmann M, Breisinger S, Eppinger S, Kern WV, Bauer TM. (2004): Nosocomial acquisition of dengue *Emerg Infect Dis*; 10(10):1872-1873.
- Wallace J, Woda BA, Pihan G. (2005): Facile, comprehensive, high-throughput genotyping of human genital papillomaviruses using spectrally addressable liquid bead microarrays *J Mol Diagn*; 7(1):72-80.
- Wamala JF, Lukwago L, Malimbo M, Nguku P, Yoti Z, Musenero M, Amone J, Mbabazi W, Nanyunja M, Zaramba S, et al. (2010): Ebola hemorrhagic fever associated with novel virus strain, Uganda, 2007-2008 *Emerg Infect Dis*; 16(7):1087-1092.
- Watts DM: Crimean-Congo hemorrhagic fever. The arbovirus: epidemiology and ecology, CRC Press, Boca Raton 1988
- Weber F, Mirazimi A. (2008): Interferon and cytokine responses to Crimean Congo hemorrhagic fever virus; an emerging and neglected viral zoonosis *Cytokine Growth Factor Rev*; 19(5-6):395-404.
- Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S. (2009): Progress towards a dengue vaccine *Lancet Infect Dis*; 9(11):678-687.
- Weidmann M, Muhlberger E, Hufert FT. (2004): Rapid detection protocol for filoviruses *J Clin Virol*; 39 (1):94-99.
- Weidmann M, Hufert FT, Sall AA. (2007): Viral load among patients infected with Marburgvirus in Angola *J Clin Virol*; 39(1):65-66.
- Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sall AA, Ly PO, Thiongane Y, Lo MM, Schley H, Hufert FT. (2008): Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses *J Clin Virol*; 41(2):138-142.
- Weidmann M, Faye O, Kranaster R, Marx A, Nunes MRT, Vasconcelos PFC, Hufert FT, Sall AA. (2010): Improved LNA probe-based assay for the detection of African and South American yellow fever virus strains *J Clin Virol*; 48(3):187-192.
- WHO. Ebola haemorrhagic fever in Zaire in 1976. In: *Bulletin of the World Health Organization*, World Health Organization, Geneva. 1978:271-293.
- WHO: Lassa fever, Factsheet No 179, World Health Organization, Factsheet No 179, Geneva 2005a, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs179/en
- WHO: Lassa fever, Factsheet No 179, World Health Organization, WHO Newsletter, Geneva 2005b, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs179/en/>
- WHO: End of the Ebola Outbreak in the Democratic Republic of the Congo, Global Alert and Response (GAR), World Health Organization, Geneva 2009a, http://www.who.int/csr/don/2009_02_17/en/index.html
- WHO: Dengue and Dengue haemorrhagic fever, Factsheet No 117, Factsheet No117, World Health Organization, Geneva 2009b, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/print.htm>
- WHO: Disease Outbreak News, World Health Organization, Geneva 2011, <http://www.who.int/csr/don/en/>
- Williams RJ, Al-Busaidy S, Mehta FR, Maupin GO, Wagoner KD, Al-Awaidy S, Suleiman AJ, Khan AS, Peters CJ, Ksiazek TG. (2000): Crimean-congo haemorrhagic fever: a seroepidemiological and tick survey in the Sultanate of Oman *Trop Med Int Health*; 5(2):99-106.
- Wittebolle L, Verstuyft K, Verstraete W, Boon N. (2006): Optimisation of the amino-carboxy coupling of oligonucleotides to beads used in liquid arrays *J Chem Technol Biot*; 81(3):476-480.
- Wolfel R, Paweska JT, Petersen N, Grobbelaar AA, Leman PA, Hewson R, Georges-Courbot MC, Papa A, Gunther S, Drosten C. (2007): Virus detection and

monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients
Emerg Infect Dis; 13(7):1097-1100.

Danksagung:

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. F.T. Hufert für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Ermöglichung zur Durchführung dieser Arbeit in der Abteilung Virologie des Universitätsklinikums bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere weiterhin meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. Manfred Weidmann für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, für seine Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit meiner Dissertation und ganz besonders für die sorgfältigen Korrekturen an meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Meik Dilcher für die wunderbare Zusammenarbeit. Er hat dafür gesorgt, dass ich während der vielen Rückschläge und Frustrationen, welche die Laborarbeit mit sich bringt, nie die Motivation verloren habe. Es war sehr beruhigend, dass ich ihn jederzeit um Rat und Tat bitten konnte und er immer ein offenes Ohr hatte für jedes Problem während der gesamten Zeit meiner Dissertation. Er war mit Sicherheit der beste Betreuer, den man sich für eine Doktorarbeit wünschen kann!

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hufert, die mich so phantastisch unterstützt und mich in die praktische Laborarbeit eingeführt haben. Es gab immer jemanden, den ich um Rat fragen konnte, wenn ein Problem auftrat. Großen Dank schulde ich hier insbesondere Tanja Gall für die große Hilfe bei vielen Tätigkeiten der Laborarbeit. Ohne sie wäre diese Arbeit wohl nicht möglich gewesen.