Aus dem Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin Hamburg,
Abteilung für Virologie.
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schmitz

Klinische Untersuchungen zur Identifizierung akuter Lassavirus-Infektionen in Guinea und Erprobung zweier Immunoblots zum Nachweis von IgG/IgM und IgM

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von:
Thorsten Wittekindt
aus Bonn
Hamburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 5. Sept. 2003

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H. Schmitz

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. R. Laufs

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. B. Fleischer

.....

A. EINLEITUNG 1
A.1 Das Lassavirus 1
A.2 Klinik der Lassavirus-Infektion 5
A.3 Symptomenkomplexe 7
A.4 Pathologie 8
A.5 Immunologie 9
A.6 Therapie 10
A.7 Nachweismethoden 10
A.8 Krankenhaus Gueckedou 12
A.9 Ziele der vorliegenden Arbeit 13

B. MATERIALIEN 14
B.1 Einschlußkriterien.....14
B.2 Patientenmaterialien 15
B.2.1 Serum von Akutkranken (Krankenhaus Gueckedou) 15
B.2.2 Serum aus Seroprävalenzstudien 16
B2.3 Serum von gesunden Blutspendern und von Patienten des Bernhard Nocht Instituts 16
B.2.4 Citratplasma 16
B.2.5 Urin 16
B.3 Labormaterialien 18
B.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz 18
B.3.2 IgM-Elisa und IgM-Maus-Ascites-Elisa 18
B.3.3 IgG/IgM-Immunoblot und IgM-Immunoblot 20
B.3.4 RT-PCR 22

C. METHODEN 23
C.1 Patientenfragebogen 23
C.2 Labormethoden 23
C.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz 23
C.2.2 IgM-Elisa I und II 24

C.2.3 IgG/IgM-Immunoblot und IgM-Immunoblot 25
C.2.4 RT-PCR 31
C.2.5 Weitere Untersuchungsmethoden 32
D. ERGEBNISSE 34
D.1 Laborergebnisse 34
D.1.1 Indirekte Immunfluoreszenz 34
D.1.2 IgM-Elisa I und II 35
D.1.3 IgG/IgM-Immunoblot und IgM-Immunoblot 35
D.1.3.1 Sensitivität 36
D.1.3.2. Spezifität 36
D.1.4 RT-PCR 39
D.2 Patientenkasuistiken 41
D.2.1 Kasuistik LG32 41
D.2.2 Kasuistik LG53 43
D.2.3 Kasuistik LG30 44
D.2.4 Kasuistik LG55 45

E. DISKUSSION 47
E.1 IgG/IgM-Immunoblot 47
E.1.1 Sensitivität 47
E.1.2 Spezifität 49
E.2 IgM-Immunoblot 50
E.3 Kritische Würdigung der publizierten grundlegenden Lassavirus-Studien 52
E.3.1 Virusnachweis 56
E.3.2 IgG-Serokonversionen 58
E.3.3 IgM-Nachweis 60
E.4 Interpretation der eigenen klinischen und virologischen Untersuchungen 62
E.4.1 Beurteilung der prädiktiven Parameter im klinischen Alltag ..66

F. ZUSAMMENFASSUNG 69

G. LITERATUR 71

H. ABKÜRZUNGEN 85

I. ANLAGE 87
I.1.1 Fragebogen 87
I.1.2 Beispiel: Dokumentation des Immunoblots 91
I.1.3 Übersichtskarte Westafrika 92
I .1.4 Karte Guinea 93

A. EINLEITUNG

Das Lassafieber ist eine zu den hämorrhagischen Fiebern zählende Virusinfektion, die in Westafrika endemisch ist. Benannt wurde es nach dem Dorf Lassa in Nigeria. Dort war es im örtlichen Krankenhaus 1969 im Rahmen einer lokalen Epidemie erstmalig als neues Krankheitsbild beschrieben worden. 1970 gelang es in den USA, das Virus in der Zellkultur zu isolieren (Frame et al., 1970).

Seitdem sind wiederholt kleinere Epidemien im Westafrika, besonders in Liberia und Sierra Leone aufgetreten. Der letzte von der WHO aus Sierra Leone gemeldete Ausbruch (1996 / 1997) umfaßte mehr als 800 registrierte Erkrankte und forderte über 150 Tote.

Darüberhinaus kommt es außerhalb Westafrikas zu importierten Infektionen. Im Jahr 2000 gelangten zwei Patienten mit Lassafieber nach Deutschland.

A.1 Das Lassavirus

Das Lassavirus gehört zu den Arenaviren. Bei diesen handelt es sich um einzelsträngige RNA-Viren mit Verbreitung in der alten und neuen Welt (Altwelt-Arenaviren bzw Neuwelt-Arenaviren). Die natürlichen Wirte der Arenaviren sind überwiegend Nagetiere.

Unter den humanpathogenen Erregern finden sich u.a. das LCM-Virus (Erreger der lymphozytären Choriomeningitis), das Machupo-Virus (Erreger des bolivianischen hämorrhagischen Fiebers) und das Junin-Virus (Erreger des argentinischen hämorrhagischen Fiebers). Auch in

neuerer Zeit wurden noch weitere humanpathogene Arenaviren wie das Whitewater Arroyo Virus beschrieben.

Die Arenaviren enthalten zahlreiche Ribosomen, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als elektronendichte Partikel erscheinen und ihnen ein „sandiges“ Aussehen verleihen. Dieses Merkmal hat der Familie der Arenaviren (Arena, spanisch = Sand) ihren Namen gegeben.

Das Lassavirus weist eine Größe von 62 bis über 200 nm auf. Es besteht aus einer lipidlöslichen Hülle in die zwei Glycoproteine (GP 1 und 2) eingelagert sind und dem Nukleoprotein. Neben der ribosomalen RNA, die während der Virus-Morphogenese aus der Wirtszelle übernommen wurde, besteht die virale RNA aus zwei einzelsträngigen RNA-Segmenten in Form einer langen (L-)Kette und einer kurzen (S-)Kette. Sie werden von Nukleoprotein umhüllt, mit dem sie das Nukleokapsid bilden. Das L-RNA Segment enhält zwei Gene, die die virale Polymerase und das kleine regulatorische Z-Protein codieren. Das S-RNA-Segment enthält die Gene, die das Nukleoprotein sowie das Precursor-Protein GPC codieren, aus dem die beiden Glycoproteine (GP1 und GP2) hervorgehen (Fields 2001).

Nach Analyse der Nukleoproteine lassen sich die derzeit bekannten Lassavirus-Isolate phylogenetisch vier sogenannten Linien zuordnen. Diese exsistieren in drei räumlich von einander getrennten Regionen in Nigeria, sowie im Grenzgebiet zwischen Guinea, Liberia und Sierra Leone (Bowen et al., 2000). Außerdem gibt es Hinweise für das Vorhandensein einer fünften Linie (Günther et al., 2000)

Aus diesen Linien haben zwei Virusisolate als Laborstämme weite Verbreitung gefunden, der Josiah-Stamm aus Sierra Leone und der Nigeria-Stamm. Kenntnisse über eine unterschiedliche Virulenz solcher Linien gibt es jedoch bisher nicht.

Natürlicher Wirt des Virus sind zu den Mäusen zählenden Nager der Gattung Mastomys. Unter diesem Gattungsbegriff verbirgt sich eine Gruppe, taxonomisch schwer einzuordnender Mausarten (Rosevear, D.R.; The Rodents of West Afrika). Mastomys ist in Savanne und Regenwaldgebieten südlich der Sahara verbreitet und lebt bevorzugt in engem Kontakt zu menschlichen Behausungen. Untersuchungen von Bowen et al. legen nahe, daß Mastomys nur geringe Wanderungsbewegungen unternimmt und so die Ausbildung verschiedener Lassavirus-Linien begünstigt haben könnte (Bowen et al., 2000).

Die Infektion bei Mastomys kann zwischen erwachsenen Tieren sexuell übertragen werden (horizontaler Übertragungsweg) und führt dann zu einer selbstlimitierenden Infektion mit nur geringem Einfluß auf die Fortpflanzungsfähigkeit. Infizierte weibliche Tiere können die Infektion auf ihre Nachkommen diaplazentar übertragen (vertikaler Übertragungsweg). Dies führt zu einer persistierenden Infektion bei den Nachkommen ohne wesentliche Auswirkung auf die Fruchtbarkeit. Hieraus resultieren teilweise sehr hohe Durchseuchungsraten der Mausbestände mit Lassaviren von bis zu 80 % . Von infizierten Tieren wird das Virus über den Urin ausgeschieden (Fields Virologie, Vol.2, 2001).

Der Übertragungsweg von der Maus auf den Menschen ist bislang nicht eindeutig geklärt. Experimentelle Daten haben gezeigt, daß das Virus insbesondere bei niedriger Luftfeuchtigkeit nach Ausscheidung für mehrere Stunden stabil bleibt (Fields Virologie, Vol.2, 2001, S. 1259).
In Frage kommen Infektionen über mit Exkrementen verunreinigte Lebensmittel, sofern diese anschließend nicht erhitzt wurden. Diskutiert wird auch die Bildung von Aerosolen aus Staub, der mit virushaltigem Mäuseurin kontaminiert ist und der über Inhalation zur Infektion führen könnte. Außerdem scheint eine Infektion auch über den direkten Kontakt beim Fang von infizierten Mastomys, sowie bei deren Zubereitung für den Verzehr möglich (ter Meulen et al., 1996).
Darüberhinaus spielt die Infektion von Mensch zu Mensch eine Rolle. Bei infizierten Personen können Gewebe, Blut, Urin und andere Körperflüssigkeiten zeitweise infektiös sein. Das Virus ist in der Lage, durch Verletzungen der Haut und durch intakte Schleimhäute in den Körper einzudringen. Durch unzureichend sterilisiertes medizinisches Gerät und engen körperlichen Kontakt ist es wiederholt zu Hospitalinfektionen gekommen (Fischer-Hoch et al.,1995).
Außerdem können durch engen häuslichen Kontakt mit Infizierten, sowie durch Geschlechtsverkehr, Infektionen übertragen werden (Monath et al., 1973).

A.2 Klinik der Lassavirus-Infektion

Das klinische Bild einer Lassavirus-Infektion variiert in weiten Grenzen. Es wird vermutet das 70 - 90 % der Infektionen asymptomatisch verlaufen oder aufgrund ihrer milden Symptomatik als „grippaler Infekt“ mißgedeutet werden.

Diese hohen Zahlen errechnen sich aus Seroprävalenzstudien (McCormick et al., 1987a). Die Untersuchungen zum klinischen Bild des Lassafiebers beruhen zumeist auf Untersuchungen an stationären Patienten. Die Möglichkeiten für Erkrankte, in einem Krankenhaus aufgenommen zu werden, können aufgrund mannigfaltiger Einflüsse (Infrastruktur, Kosten der Behandlung, Kriterien für die stationäre Aufnahme) schwanken. Daher ergeben die Studien zur Schwere des Verlaufs unterschiedliche Angaben.

Untersuchungen von McCormick et al. (1987a, 1987b) in Sierra Leone an stationären Patienten mit klinisch schwerem Verlauf ergaben folgendes Bild:

Nach einer Inkubationszeit von 7 bis 18 Tagen kommt es zu einem bis zu drei Tage dauernden Prodromalstadium mit Symptomen, die denen eines grippalen Infekt entsprechen: Allgemeines Krankheitsgefühl, leichtes Fieber, Gelenk-, Kopf- und Rückenschmerzen.

Ab dem dritten bis etwa zum sechsten Krankheitstag kommt es zu einem allmählichen Fieberanstieg auf 39 °C bis 41 °C. Zu den häufigen Symptomen in diesem Stadium gehören eine Konjunktivitis, trockener Husten mit retrosternalen Schmerzen, eine exsudative Pharyngitis sowie

eine gastrointestinale Symptomatik mit abdominellen Schmerzen, Erbrechen und Diarrhoe (McCormick et al., 1987b).

Ab dem 7. bis 12. Krankheitstag kommt es bei günstigem Verlauf in ca. 85 % der Fälle zu einem Rückgang des Fiebers sowie der pharyngealen, thorakalen und abdominellen Schmerzen. Als Spätkomplikationen in dieser Phase kann es bei ca. 17 % der Seropositiven und 29 % der manifest Erkrankten zu einer bleibenden ein- oder beidseitigen Innenohrschwerhörigkeit kommen (Cummins et al., 1990; Solbrig et McCormick, 1991). Auch Perikardreiben, gefolgt von Perikardergüssen, Pleuraergüsse sowie zentralnervöse Störungen scheinen gehäuft mit einer Lassavirus-Infektion verknüpft zu sein (McCormick et al., 1987b; Johnson et al., 1987).

Bei ca. 15 % kommt es jedoch zu einer progressiven Verschlechterung. Neben fortgesetztem Erbrechen entwickelt sich ein Ödem im Bereich von Kopf und Hals, eine zunehmende respiratorische Insuffizienz und teilweise eine Enzephalopathie (Delir).

Der Tod kann als Folge der vorgenannten Symptome oder im Rahmen eines finalen Schockgeschehens eintreten (McCormick et al., 1987b).

Die für hämorrhagische Fieber typischen Blutungen treten bei diesen schwerkranken Patienten nur in ca. 17 % auf. Sie betreffen in der Regel die Schleimhäute als Nasen- und Zahnfleischblutungen sowie als gastrointestinale oder urogenitale Blutungen. Bemerkenswert ist, daß weitergehende Untersuchungen als Ursache für die Blutungen eine disseminierte Gerinnung (DIC), eine Thrombzytopenie oder schwere Störungen der Gerinnungsfaktoren sowie histopathologische

Veränderungen an den Kapillaren ausschließen konnten. Man führt sie derzeit auf eine funktionelle Störung des Gefäßendothels mit vermehrter Permeabilität für Plasma und zelluläre Blutbestandteile („kapillary leakage Syndrome“) sowie auf eine noch zu definierende Thrombzytenfunktionsstörung zurück (Knobloch et al., 1980; Cummins et al., 1989b).

Schwere Verläufe finden sich gehäuft bei Schwangeren im letzten Trimenon. Der Anteil der letalen Verläufe liegt über 25 %. In über 85 % kommt es zu Fehl- oder Totgeburten (Price et al., 1988).

Bei Kindern liegt die Letalität zwischen 12 und 27 %. Bei Kleinkindern kann es durch eine Lassavirus-Infektion zu einem generalisierten Ödem mit abdomineller Schwellung und erhöhter Blutungsneigung, dem sogenannten Swollen Baby Syndrom, kommen (Webb et al., 1986; Monson et al., 1987).

A.3 Symtomenkomplexe

Zur Verbesserung der klinischen Identifizierung an Lassafieber Erkrankter bei Fehlen eines pathognomonischen Symptoms hat man versucht, Symptomenkomplexe mit höherem Vorhersagewert zu finden. Für die Kombination Fieber, Pharyngitis, retrosternale Schmerzen und Proteinurie bei Patienten in einem Endemiegebiet wurde bislang der höchste Voraussagewert (0,81) für das Vorliegen von Lassafieber gefunden.

Für den Symptomenkomplex Halschmerzen, Erbrechen, Blutungen und Fieber >39 °C, fand sich ein positiver Vorhersagewert für einen letalen Verlauf von 0,57.

Von den Laborveränderungen waren eine Virämie >103,6 TCID 50/ml in 75 % der Fälle und Serum-AST-Spiegel >150 IU/l in 61 % mit einem letalen Ausgang assoziiert (McCormick et al., 1987b).

A.4 Pathologie

Nach Eindringen des Virus über die intakte Schleimhaut, verletzte Hautstellen, durch Kontakt mit virushaltigen Flüssigkeiten oder Inhalation von virushaltigen Aerosolen kommt es primär zur Vermehrung in den Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems (Lewis et al., 1989). Das Virus ist pantrop, so daß nachfolgend zahlreiche Organe infiziert werden.

Die histopathologischen Veränderungen sind zumeist relativ gering. Von klinischer Bedeutung sind multifokale hepatozelluläre Nekrosen (bis zu 40 % der Zellen), die zu einer klinisch faßbaren Hepatitis führen können (Winn et al., 1975; Walker et al., 1982). Die Höhe der AST stellt auch einen prognostischen Faktor dar (McCormick et al., 1987b).

Bei Befall der Nieren kann es zu Tubulusnekrosen kommen. Weitere wichtige Organmanifestationen sind eine Myokarditis, Perikarditis mit Perikarderguß, eine interstitielle Pneumonie sowie Pleuraergüsse (Walker et al., 1982; McCormick et al.,1987b). Der Befall des zentralen Nervensystems kann zu einer Enzephalitis und zu zentralen Hörstörungen führen (Cummins et al., 1990; Solbrig et al., 1991). Das

Virus kann unter Umständen selektiv durch PCR im Liquor nachgewiesen werden (Robert-Koch-Institut, 2000).

Auch nach überstandener Erkrankung wird das Virus beim Menschen bis zu zwei Monate über den Urin ausgeschieden.

A.5 Immunologie

Immunologische Daten über Lassavirus-Infektionen beim Menschen liegen kaum vor.

Die meisten Kenntnisse über Infektionen mit Arenaviren beruhen auf Ergebnissen, die mit einem anderen Arenavirus, dem LCM-Virus im Tiermodell gewonnen wurden. Diese Ergebnisse sind nur unter Vorbehalt übertragbar. Auffällig ist, daß sich nach Lassavirus-Infektionen nur niedrige Titer neutralisierender Antikörper finden (Jahrling et al.,1983).

Aufgrund von Daten, die aus Impfversuchen mit attenuierten verwandten Arenaviren oder gentechnisch verändertem Vaccina-Virus mit Expression von Lassavirus GP und NP am Meerschweinchen und Rhesusaffen gewonnen wurden, ist zu vermuten, daß T-Zellen (CD4+ und CD8+) eine besondere Bedeutung für die Viruselimination besitzen (Jahrling et al.,1986, Clegg et al.,1992 ter Meulen, 1999; Fischer-Hoch et al., 2000.).

Seroprävalenzdaten geben Hinweise auf mögliche wiederholte Infektionen mit dem Lassavirus (McCormick et al., 1987a).

In wieweit hierfür Virusvarianten oder immunologische Besonderheiten des Wirtes (MHC-System) verantwortlich sind, ist bislang nicht hinreichend bekannt.

Es wird zu dem spekuliert, daß die gelegentliche beobachtete Enzephalitis sowie die Innenohrschwerhörigkeit möglicherweise Folge der Aktivität zytotoxischer T-Zellen (CD8+) ist (ter Meulen, 1999).

A.6 Therapie

Außer einer allgemeinen, supportiven Therapie steht seit 1986 mit dem Nukleosidanalogon Ribavirin eine spezifische Therapie zur Verfügung (McCormick et al., 1986).

Dank intravenöser Gabe von 30 mg Ribavirin/kg/KG als Initialdosis sowie 16 mg/kg/KG alle sechs Stunden für vier Tage und anschließender Gabe von 8 mg/kg/KG alle 8 Stunden für weitere sechs Tage, läßt sich bei Beginn der Behandlung innerhalb von sechs Tagen ab Krankheitsbeginn die Letalität von 78 % auf 9 % (Virämie >103,6 TCID 50/ml) bzw. von 61 % auf 5 % (Serum AST-Spiegel >150 IU/l) senken. Erfolgt die Behandlung nach dem sechsten Tag läßt sich die Letalität noch auf 47 % bzw. 26 % senken (McCormick et al., 1986). Derzeit gibt es Überlegungen, daß die oben angeführten Dosierungen für Ribavirin um den Faktor zwei zu hoch sind.

A.7 Nachweismethoden

Die bislang sicherste Nachweismethode ist die Virusisolierung. Diese kann aus dem Blut vom ersten bis 20. Krankheitstag möglich sein. Außerdem läßt sich das Virus auch aus Halsabstrichen, Muttermilch, Liquor sowie pleuralen und perikardialen Exsudaten anzüchten. Urin ist für die Anzucht während der akuten Krankheitsphase weniger geeignet. Dafür kann aus dem Urin nach überstandener

akuter Erkrankung eine Virusisolierung noch für ein bis zwei Monate möglich sein (Fischer-Hoch et al., 1987).

Das Lassavirus kann auf Vero (Affennierenzellen) und auf U 937 Zellen (Humane Monozytenlinie) kultiviert werden (Lukashevich et al., 1983; Lewis et al., 1989) und mittels Indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Aufgrund der recht langen Dauer von vier bis sieben Tagen sowie der erforderlichen technischen Voraussetzungen (L4-Labor) ist sie für die Routinediagnostik in Afrika nicht geeignet.

Als Alternative zur Virusisolierung besteht die Möglichkeit des Nachweises der Lassa-RNA mittels RT-PCR (Lunkenheimer et al., 1990; Trappier et al., 1993; Demby et al., 1994). Diese Testmethode ist sehr spezifisch, jedoch technisch aufwendig.

Wie bei anderen Viruserkrankungen ist auch bei Lassafieber ein Antikörpernachweis möglich. Antikörper der Klassen IgM und IgG werden bei einigen der Erkrankten ab dem dritten Krankheitstag nachweisbar, jedoch lassen sich mit den bislang verfügbaren Techniken nur bei 55 % der Patienten in der ersten Woche Antikörper nachweisen (Wulff et Johnson, 1979; Niklasson et al., 1984).

Darüberhinaus haben in Endemiegebieten bis zu 50 % der Patienten Antikörper (IgG). In den Untersuchungen von McCormick (1987a, 1987b) wurden Serokonversionen von Titern < 1/4 bis $\geq$ 1/16 sowie Nachweis von Lassa-spezifischem IgM zur Definition einer akuten Infektion benutzt.

Die gebräuchlichste Technik zum Antikörpernachweis ist die Indirekte Immunfluoreszenz (IIF).

Außerdem existieren ELISA-Teste entweder mit aufgereinigtem Virus (Josiah-Stamm) (Niklasson et al., 1984) oder mit rekombinaten Nukleoprotein (Nigeria-Stamm) als Antigen (Barber et al., 1987; 1990), sowie ein Elisa-Test mit Monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von Virusantigen (Bausch et al., 2000).

A.8 Krankenhaus Gueckedou

Die folgenden Untersuchungen wurden an Patienten im Krankenhaus Gueckedou in Guinea / Westafrika durchgeführt, die dort im Rahmen der regulären medizinischen Versorgung behandelt wurden.

Dabei handelt es sich um ein Distrikthospital. Dieses liegt im Dreiländereck Guineas mit Grenzen nach Liberia im Südwesten und Sierra Leone im Osten (vgl. Karten im Anhang). Da zum Zeitpunkt der Untersuchung Bürgerkrieg in Liberia und Sierra Leone herrschte, gab es in der Umgebung der Stadt zahlreiche Flüchtlingscamps, die vom UNHCR betreut wurden. Diese Patienten wurden ebenfalls im Krankenhaus behandelt.

Im Krankenhaus bestanden vier Abteilungen: eine chirurgische, eine gynäkologische, eine pädiatrische und eine allgemeinmedizinische Station (Mèdicine Générale). Das Krankengut der letztgenannten Station umfaßte überwiegend Patienten mit Infektionen sowie mit neurologischen Symptomen.

An apparativer Diagnostik war ein Röntgengerät vorhanden. Aufgrund der fehlerhaften Bildqualität sowie zeitlich stark limitierter Verfügbarkeit, bei fehlender Stromversorgung während des Tages, wurde es überwiegend in der Diagnostik von Frakturen eingesetzt. Der Aufbau einer Ultraschalldiagnostik erfolgte erst während des zweiten Aufenthaltes.

Das Labor hatte einen für guineische Verhältnisse sehr guten Standard. Das Spektrum umfaßte die parasitologische Stuhldiagnostik, Untersuchung auf Malaria, Hämoglobinbestimmung, Liquoruntersuchung, sowie Blutgruppenbestimmung.

Blutuntersuchungen auf Lues, Hepatitis B, HIV, etc. konnten in Einzelfällen durchgeführt werden (Einzelheiten siehe Methoden).

Aufgrund von Voruntersuchungen (ter Meulen et al., 1996) war bekannt, daß in der Region von Gueckedou eine hohe Antikörperprävalenz (14 %) für Lassavirus besteht. Akute Lassavirus-Erkrankungen oder Epidemien waren jedoch nicht bekannt. Da diese Region in enger geographischer Nähe zu Liberia und Sierra Leone liegt, von wo regelmäßig Ausbrüche des Lassafiebers gemeldet wurden, bestand die Vermutung, daß auftretende Lassavirusfälle als solche nicht erkannt werden.

A.9 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

1. Klinische und laborchemische Identifikation akuter Lassavirus-Infektionen bei Patienten mit Fieber unklarer Ursache.

2. Entwicklung und Evaluierung eines einfachen Testes zur Erfassung von IgM und IgG zur späteren Anwendung unter den Bedingungen eines afrikanischen Krankenhauses.

B. MATERIAL

B.1 Einschlußkriterien

Während zweier je dreimonatiger Aufenthalte 1995 und 1996 wurden im Krankenhaus Gueckedou Patienten der allgemeinmedizinischen Station im Rahmen der Studie untersucht.

Die Patienten wurden in üblicher Weise im Krankenhaus aufgenommen. Ergaben die Aufnahmeuntersuchungen den Verdacht auf das Vorliegen eines unklaren Fiebers durch Fehlen einer offensichtlichen Fieberursache z.B. eines Abszesses oder einer infizierten Wunde wurden die Patienten über die Studie zur Untersuchung auf Lassafieber informiert. Dies geschah in mündlicher Form, häufig unter zur Hilfenahme eines Dolmetschers. Gaben die Patienten ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie, erfolgte eine erweiterte Anamnese und die Untersuchungsergebnisse wurden in einem Untersuchungsblatt gemäß Anlage protokolliert.

Einschlußkriterium für die Studie war das Eingangskriterium Fieber ($\geq$ 38°C) unklarer Genese. Patienten bei denen zum Zeitpunkt der Aufnahme ein eindeutiges bakterielles Krankheitsbild vorlag, wurden von der Studie ausgeschlossen. Der Nachweis einer Malaria durch den „Dicken Tropfen“ wurde aufgrund der Häufigkeit dieses Befundes in dem untersuchten Patientenkollektiv nicht als Ausschlußkriterium gewertet. Nach Abschluß der körperlichen Untersuchungen wurde dem Patienten 10 ml Vollblut sowie 5 ml Citratblut entnommen. Im weiteren Verlauf wurden die Patienten täglich besucht und der weitere klinische Verlauf dokumentiert. Weitere Blutentnahmen folgten im Abstand von 5 bis 7 Tagen.

B.2 Patientenmaterialien

B.2.1 Serum von Akutkranken (Krankenhaus Gueckedou)

Das abgenommene Vollblut wurde zentrifugiert (10 min, 3.000 UPM).

500 µl wurden mit 1 ml GIT-Lysispuffer versetzt und bei ca. 4 °C gelagert. Dies geschah unter der Vorstellung, den Abbau viraler RNA durch im Serum vorkommende RNAsen zu verhindern. Die Stabilität viraler RNA im tiefgefrorenen Serum erwies sich jedoch als besser als im Serum mit GIT-Zusatz. Das restliche Serum wurde bei 56 °C 30 Minuten inaktiviert, bei -18 °C zwischengelagert und vor dem Transport nach Hamburg in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Aus Sicherheitsgründen stand die Zentrifuge in einer „Glovebox“. Nach dem zentrifugieren wurden die Röhrchen aus der Zentrifuge entnommen, durch ein Flächendesinfektionsmittel von außen desinfiziert und aus der Glovebox ausgeschleust. Die weitere Präparation erfolgte außerhalb der Glovebox unter Verwendung von Kittel, Einmalhandschuhen, Mundschutz und Schutzbrille. Der anfallende Müll wurde in Plastiksäcken gesammelt und in einer zum Labor gehörenden Tonne mit weiterem Labormüll verbrannt, um eine Wiederverwendung durch andere Personen auszuschließen.

Außerdem wurden vier Seren aus Sierra Leone untersucht, die von Mitarbeitern von „Medicine sans frontiers“ während ihrer humanitären Einsätze bei dem Verdacht auf eine Gelbfieberepidemie in Flüchtlingslagern in Sierra Leone abgenommen worden waren. Zu diesen Proben lagen jedoch keine weiteren medizinischen Informationen vor.

B.2.2 Seren aus Seroprävalenzstudien (Guinea, Sierra Leone, Liberia)

Aus Seroprävalenzstudien standen insgesamt 673, bei minus 18°C gelagerte, Seren aus Guinea (Region Pita, Region Gueckedou), Sierra Leone und Liberia mit bekanntem Antikörpertiter in der IIF als Positiv- und Negativkontrollen zur Verfügung

B.2.3 Seren von gesunden Blutspendern aus Hamburg und Patienten des Bernhard-Nocht-Instituts

Als weitere Negativkontrolle wurden Seren von gesunden Blutspendern aus Hamburg sowie Seren von Patienten des Bernhard-Nocht-Instituts verwendet, die dort wegen verschiedener Erkrankungen z.B. Malaria, Typhus, HIV oder Denguefieber behandelt worden waren.

B.2.4 Citratplasma

Das zentrifugierte Plasma (10 min, 3.000 UPM) wurde ebenfalls inaktiviert und bei -18 °C zwischengelagert. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie beim Serum.

B.2.5 Urin

Alle drei Tage wurde in sauberen Einmalplastikbechern eine Urinprobe gesammelt. Hiervon wurden 500 µl mit 1 ml GIT-Lysispuffer versetzt und bei 4 °C zwischengelagert (vgl Anmerkung zum GIT-Lysispuffer in Kapitel B.2.1). Darüberhinaus wurde der Resturin mit einem Urinteststreifen (Urinstix Böhringer Ingelheim) untersucht.

Von den nicht industriell gefertigten Materialien, die für meine Untersuchungen im Bernhard-Nocht-Institut von mir benötigt wurden, wurden mir die monoklonalen Antikörper, das Hyperimmunserum für den IgM-Elisa ll, die beschichteten Objektträger für die Immunfluoreszens, sowie das rekombinante Nukleoprotein zur Verfügung gestellt.

B.3 Labormaterialien

B.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzobjektträger mit 30 - 60 % infizierten Zellen (U397, Verozellen),

Lassavirus Josiah-Stamm

Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	8 g	NaCl	= 137 mmol
	0,2 g	Kcl	= 2,7 mmol
	1,44 g	Na_2HPO_4	= 10 mmol
	0,24 g	KH_2PO_4	= 1,8 mmol
	mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.		

2. Antikörper

Antihuman-IgG-Fluoresceinisothio**c**yanat **(Antihuman-IgG-FITC**) vom Schaf**,**

(Dianova, Hamburg, Germany)

B.3.2 IgM-ELISA I und II

IgM-Elisa-Platten

(Fa.: MEDAC)

IgM-Elisa-Waschpuffer

NaCl	150 mMol
Tris-HCl ph 7,5	10 mMol
TWEEN 20	0,1 %

Lassavirus-Überstand

Der Überstand mit Lassavirus (Josiah-Stamm) infizierter Zellkulturen wurde abpipetiert und mit einem nichtionischen Tensid (NP 40, Endkonzentration 1 %) versetzt.

Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper waren entsprechend einer Arbeitsvorschrift von Hufert et al. (1989) hergestellt.

Hyperimmunserum für IgM-Elisa II

Das Hyperimmunserum stammte aus Infektionsversuchen mit Lassavirus (Josiah-Stamm) an Mastomys Ende der 80er Jahre. Durch viermalige Injektion von infektiösen Lassaviren im Abstand von je 7 Tagen in die Peritonealhöhle von Mastomys waren diese infiziert worden. Nach weiteren 5 Tagen wurden die Tiere getötet und entblutet. Das Serum wurde abzentifugiert, bei 56°C über 30 Minuten inaktiviert, eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Streptavidin POD-Lösung

PBS rot	5 ml
Mausserum	50 µl
Humanserum (Lassa-negativ)	50 µl
Streptavidin-POD	5 µl

Substrat

Tetramethylbenzidin (TMB)

1 Substrattablette in 7 ml Lösungsmittel (Fa. MEDAC)

Stopplösung

1N H_2SO_4

PBS rot

PBS	
Natriumacid	0,1 % Endkonzentration
Phenolrot	in geringer Menge zur farblichen Kennzeichnung

B.3.3 IgG/IgM-Immunoblot und IgM-Immunoblot

Rekombinantes Protein

Rekombinantes Lassavirus-Nukleoprotein (Stamm Josiah) war wie in ter Meulen et al.: 1998 beschrieben hergestellt worden. Das größte, exprimierbare Fragment betrug ca 75 % des Proteins (aa 141 bis 569). Es wurde aus den unlöslichen Einschlußkörperchen mittels eines denaturierenden Puffers (8 M Harnstoff) gewonnen und durch Nickel-Chelat-Chromatographie (Ni-Agarose-Säule, Protokoll und Reagentien der Firma QIAGEN) gereinigt (Reinheitsgrad > 99 %).
Das rekombinante Protein wurde gegen PBS dialysiert, anschließend in 2 % SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 6,8) gelöst und bis zur Weiterverwendung bei minus 20 °C gelagert.
Die Konzentration des rekombinanten Nukleoproteins wurde photometrisch in Anlehnung an eine BSA-Standartkurve bestimmt und Verdünnungen mit 5 µg / 3 µl, 1 µg / 3 µl, 100 ng / 3 µl und 10 ng / 3 µl hergestellt.
Als Negativkontrolle diente eine Lösung aus Hühner-Lysozym in 2 % SDS/DTT/Tris-HCl in der Konzentration 5 µg / 3 µl und 1 µg / 3µl .

Hühner-Lysozym: (LYS; Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)

Blot-Puffer: 2 % SDS, 100 mM DTT

Membrane: Protran-Nitrocellulose (S&S, Nr. BA 79; 0,1 µm, Ref. 402096)

TBST-Puffer: 10 mM Tris-HCL (pH 7,8)

150 mM NaCl

0,1 % TWEEN 20

TBST/10 % fettarme Milch:

TBST-Puffer

10 % fettarme H-Milch (0,3%)

1,5 M NaCl

0,5 M Tris-HCl (pH 7,8)

NT - Puffer: 100 mM NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 7,8)

Konjugat: anti-human lgG/IgM-POD (DIANOVA, Nr.109-035-044)

oder: anti-human IgM-POD (Verdünnung 1/1000)

Färbelösung: A) 10 ml NT

20 µl H_20_2

B) 2 ml Methanol (-20 °C), dem eine kleine Spatelspitze Chloro-1-naphtol hinzugefügt wurde

Die Komponenten A und B der Färbelösung wurden kurz vor der Testdurchführung angesetzt und erst unmittelbar vor der Färbung miteinander vermischt.

Herstellung der Immunoblot-Streifen

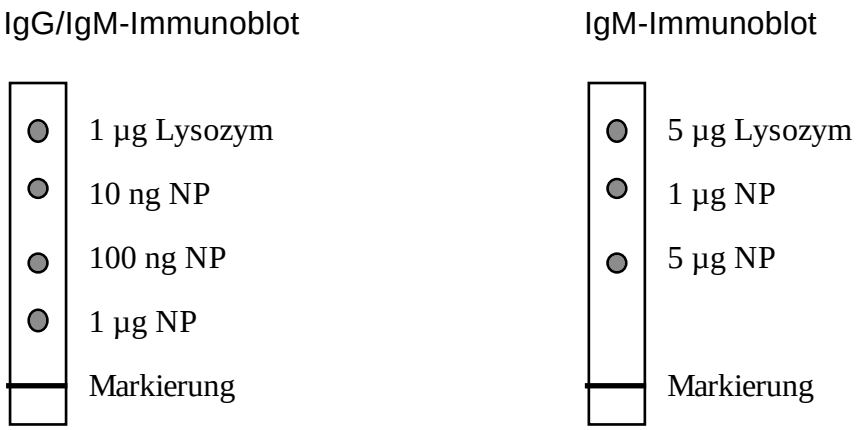
Hierzu wurden aus Nitrocellulosebögen mit einem Handpapierschneider Streifen von ca. 9 cm Länge und ca. 7 mm Breite geschnitten. Die Streifen wurden an einem Ende mit einer Bleistiftmarkierung versehen, um die Leserichtung festzulegen. Wichtig war es, die Streifen nur mit Handschuhen bzw. mit einer Pinzette zu berühren, um Verunreinigungen zu vermeiden. Auch mußte auf Ober- und Unterseite geachtet werden.

Die zuvor hergestellten Eiweislösungen (NP-Fragment, Lysozym) wurden für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend im Eisbad auf 0 °C gekühlt gehalten. Dann wurden je 3 µl der Proteinlösungen auf die vorgefertigten Streifen aus Nitrocellulose aufgetragen.

Für den IgG/IgM-Immunoblot wurden 1 µg, 100 ng und 10 ng NP und 1 µg Lysozym aufgetragen.

Die IgM-Immunoblot Streifen enthielten 5 µg und 1µg NP sowie 5 µg Lysozym.

Abbildung: Proteinauftrag beim IgG/IgM-Immunoblot und IgM-Immunoblot



B.3.4 RT-PCR

siehe Kapitel C.2.4

C METHODEN

C.1 Patientenfragebogen

Die Patienten wurden gemäß des in Kapitel B.1 beschriebenen Procederes in die Studie aufgenommen. Ihre Angaben, die Untersuchungsbefunde sowie der klinische Verlauf wurden auf dem in Anlage I. wiedergegebenen Protokoll vermerkt.

C.2 Labormethoden

Von den nachfolgend aufgeführten Methoden wurden die Untersuchung der Seren der Akutkranken (Krankenhaus Gueckedou), der Seren aus den Seroprävalenzstudien, der gesunden Blutspender und der Patienten des Bernhard-Nocht-Instituts im Immunoblot und Elisa sowie ein Teil der Immunfluoreszenzuntersuchungen selbst durchgeführt. Die korrekte Beurteilung der Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden von einem in der Immunfluoreszenz erfahrenen Mitarbeiter des Bernhard-Nocht-Instituts kontrolliert. Die Untersuchungen der Seren in der RT-PCR sowie ein Teil der Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden von Mitarbeitern des Bernhard-Nocht-Instituts durchgeführt und die Ergebnisse mir zur Verfügung gestellt.

C.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Indirekte Immunfluoreszenz wurden Ausstriche von Zellkulturen (U937 oder Verozellen) verwendet, die mit Lassavirus (Josiah-Stamm) infiziert worden waren. Diese wurden ca. eine Woche nach Infektion auf Immunfluoreszenz-Objektträgern ausgestrichen. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und bei Raumtemperatur eine Stunde fixiert.

Jede Charge wurde in einer Immunfluoreszenz mittels monoklonaler Antikörper gegen das Nukleoprotein von Lassafieber auf erfolgreiche Infektion hin überprüft (ca. 30 - 60 % Infektionsrate). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger luftdicht versiegelt und bei -18°C gelagert.
Die zu testenden Seren wurden 1 : 20 in PBS vorverdünnt, auf die Immunfluoreszenzobjektträger aufgetragen und eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Pro Testansatz wurde je eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Objektträger 2 x 15 Minuten mit PBS gewaschen.
Die Markierung erfolgte mit 1 : 50 in PBS verdünnten FITC-anti-human-IgG-Antikörpern für 30 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer. Nach erneutem Waschen erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop.
Positive Seren wurden bis zum Endpunkt in Zweierschritten ausverdünnt.

C.2.2 IgM-ELISA I und II

Prinzip des IgM-Elisa

An die mit Anti-IgM beschichteten Elisa-Mikrotiterplatten werden zunächst unspezifisch alle in den verdünnten Seren enthaltenen humanen IgM-Antikörper gebunden.
Sind unter den zugegebenen IgM-Antikörpern solche, die gegen Lassavirus-Antigen gerichtet sind, binden an diesen die im folgenden Schritt zugegebenen Virusbestandteile aus einem Lassavirus-Kulturüberstand und überstehen den folgenden Waschvorgang. Die so gebundenen Virus-Antigene können ihrerseits polyklonale Antikörper z.B. aus dem hier verwendeten Hyperimmunserum oder rekombinant erzeugte Antikörper (monoklonale Antikörper) binden. Nach anschließender Bindung eines Enzyms (Streptavidin-POD) kommt es mit einem zugegebenen Substrat (TMB) zu einer Farbreaktion.

Für den IgM-Elisa wurden mit Anti-IgM-beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Vor Gebrauch wurden diese zweimal mit sterilem PBS (200 µl / Well) gewaschen. Die zu untersuchenden Seren wurden 1 : 10, 1 : 100 und 1 : 1000 in PBS verdünnt. Es wurde je eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Pro Well wurden je 50 µl Serumverdünnung bei Zimmertemperatur für zwei Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Platten fünf mal je fünf Minuten mit IgM-Elisa Waschpuffer gewaschen.
Dann wurde Lassavirus-Überstand (50 µl / Well) aufpipetiert und über Nacht im Kühlschrank auf einem Schüttler inkubiert.
Am folgenden Tag wurden nach einem erneutem Waschvorgang (5 x 5 Minuten; 200 µl / Well) entweder Monoklonale Antikörper (IgM-Elisa I) gegen Lassavirus (je 45 µl / Well) oder Polyklonale Antikörper aus Hyperimmunserum (IgM-Elisa II) aufgebracht.
Nach 1,5 Stunden bei Zimmertemperatur folgte ein erneuter Waschvorgang (5 x 5 Minuten; 200 µl / Well).
Anschließend wurde Streptavidin POD (50 µl / Well) aufgebracht und 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichter Agitation inkubiert.
Nach einem erneuten Waschvorgang (5 x 5 Minuten; 200 µl /Well) wurde von der Substratlösung (TMB) 50 µl / Well zugegeben und ca. 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.
Gestoppt wurde mit 1N H_2SO_4-Lösung bei deutlicher Gelbfärbung der Positivkontrolle solange die Negativkontrolle keine Verfärbung zeigte.
Die Extinktion wurde im Photometer bei 492 nm gemessen. Als Cut-Off wurde ein Wert von 0,2 festgelegt (Mittelwert der Negativkontrollen plus dreifache Standardabweichung).

C.2.3 IgG/IgM-Immunoblot und IgM-Immunoblot

Die Nukleoprotein-Konzentration in einer Nukleoprotein-Stammlösung wurde photometrisch durch Messung bei 260 nm und Vergleich mit einer BSA-Standardkurve bestimmt.

Hiervon wurden Verdünnungen der Konzentration 5 µg / 3 µl, 1 µg / 3 µl, 100 ng / 3 µl, 10 ng / 3 µl hergestellt.

Als Kontrollprotein wurde Hühner-Lysozym verwendet, das im SDS/DTT-Blotpuffer aufgenommen und auf 5 µg / 3 µl und 1 µg / 3 µl Endkonzentration verdünnt wurde.

Die Eiweißlösungen wurden für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend im Eisbad bei 0 °C bis zum Auftrag aufbewahrt. Dies geschah mit dem Ziel, die Tertiärstruktur weitgehend aufzuheben und sogenannte lineare Epitope freizulegen.

Für den IgG/IgM-Immunoblot wurde vom Nukleoprotein 1µg, 100 ng und 10 ng sowie vom Lysozym 1 µg auf eine Nitrozellulose-Membran von ca. 9 cm Länge und ca. 7 mm Breite aufgetragen und trocknen gelassen (Abbildung 1, S.28).

Für den IgM-Immunoblot wurde entsprechend vom Nukleoprotein 5 µg, 1µg sowie 5 µg Lysozym verwendet (Abbildung 2, S.30).

Die fertigen Teststreifen wurden bis zur Testdurchführung einige Tage trocken aufbewahrt.

Für den Immunoblot wurden die Streifen in TBST mit 10 % fettfreier Milch für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an der Nitrocellulosemembran zu verhindern.

Zur Austestung einer Nukleoprotein-Charge wurde für den IgG/IgM-Immunoblot Serumverdünnungen einer bekannten positiven und negativen Kontrolle von 1 : 100 bis 1 : 400, für den IgM-Immunoblot Serumverdünnungen von 1 : 20 bis 1 : 100 in TBST / Milch verwendet. Die Serumkonzentration bei der sich für die Nukleoprotein-Dots eine eindeutige Dunkelfärbung ergab und die Lysozym-Kontrolle negativ blieb, wurde für die Serumverdünnung der zu testenden Seren übernommen.

Die Teststreifen wurden mit den Serumverdünnungen für 1,5 Stunden unter leichter Bewegung auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Streifen dreimal 10 Minuten in TBST gewaschen und anschließend, als Konjugat, Anti-human IgG/IgM-POD (IgG/IgM-Immunoblot) bzw.

Anti-human IgM-POD (IgM-Immunoblot) in der Verdünnung 1 : 1000 für eine Stunde aufgebracht.

Anschließend wurde erneut zweimal in TBST und abschließend einmal in NT-Puffer für je 10 Minuten gewaschen.

Gefärbt wurde mit einer Färbelösung mit Chloro-1-naphtol als Substrat.

Die Färbung bei Zimmertemperatur wurde nach ca. 15 Minuten durch Absaugen der Färbelösung beendet.

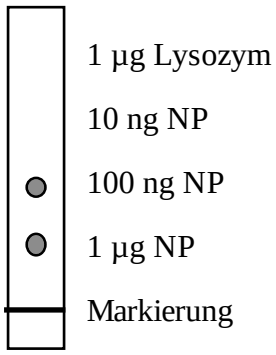
Es wurde jeweils eine Positiv- und eine Negativkontolle mitgeführt.

Als positives Resultat wurde bewertet, wenn eine gleichmäßige Blaufärbung im Bereich des Nukleoproteinauftrags erfolgte. Kam es im Bereich der Lysozymkontrolle zu einer Reaktion im Sinne eines zarten Ringes, wurde dies von der Reaktion im Bereich der Nukleoprotein-Dots „abgezogen“, was zu einer Herabstufung in der Reaktionsstärke führte. Beim IgG/IgM-Immunoblot kam es nur selten zu einer schwachen Reaktion im Bereich der niedrigsten Nukleoprotein-Konzentration (10 ng).

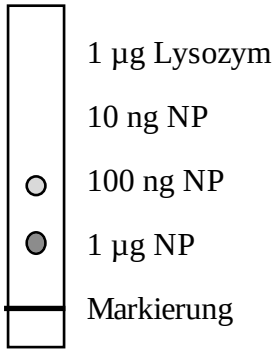
Abbildung 1: Beurteilung des IgG/IgM-Immunoblots

Positive Ergebnisse:

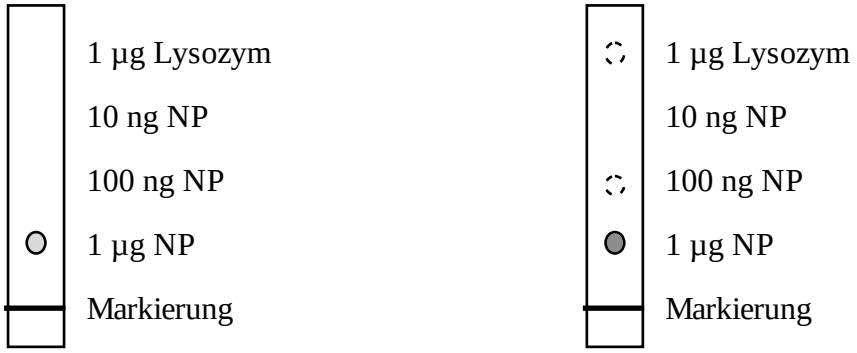
stark positives Ergebnis (3+)



mittelgradig positives Ergebnis (2+)



schwach positives Ergebnis (1+)



Negative Ergebnisse :

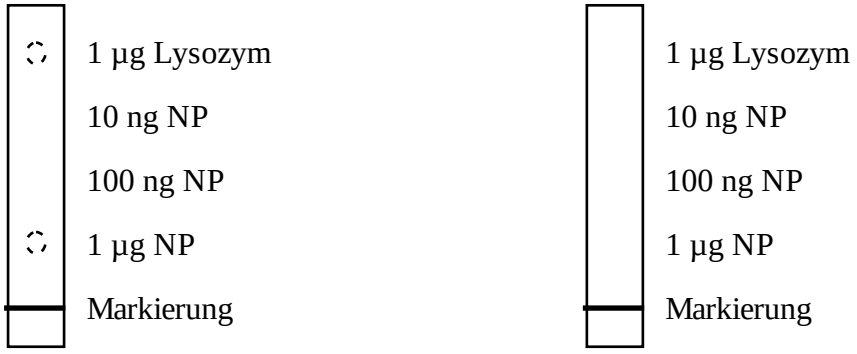
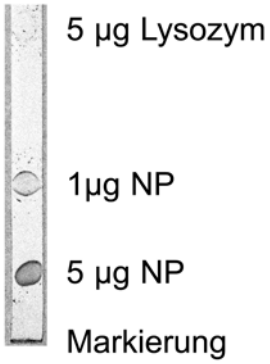


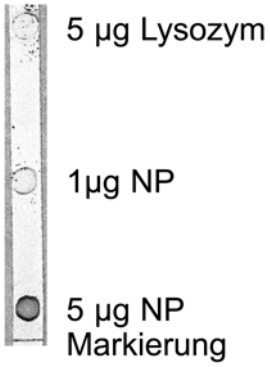
Abbildung 2: Beurteilung des IgM-Immunoblots (Fotos positiver Testergebnisse)

Positive Ergebnisse:

stark positives Ergebnis (3+)



mittelgradig positives Ergebnis (2+)



schwach positives Ergebnis (1+)

Negatives Ergebnis:

Die Resultate wurden unmittelbar nach Versuchsdurchführung protokolliert, da die Färbung nach kurzer Zeit zu verblassen begann (vgl. Anlage S.91).

C.2.4 RT- PCR

Die RT-PCR wurde gemäß der Beschreibung von Lunkenheimer et al. (1990) durchgeführt, wobei ein 232 Basenpaare großer Abschnitt des Nukleoprotein-Gens amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden zum Ausschluß von Kontaminationen durch die Positivkontrolle (Josiah-Stammm) sequenziert. Diese Untersuchungen wurden von Mitarbeitern des Bernhard-Nocht-Instituts durchgeführt (ter Meulen et al., 1998)

C.2.5 Weitere Untersuchungsmethoden

Urinuntersuchungen:

Der Urin wurden mittels Urinstix Böhringer Ingelheim (semiquantitativ) auf Glukose, Proteine, pH, Nitrat, Leukozyten, Erythrozyten, Keton, Urobilinogen und Bilirubin untersucht.

Serumuntersuchungen auf AST und ALT:

Von insgesamt 18 Patienten wurden Serumproben auf AST und bei Werten über 20 U/l auch auf ALT untersucht.

Der Test erfolgte durch Trockenchemie mittels Reflotron®-Gerät bei 25°C

		AST	ALT	
Normwerte:	Männer	26 - 37,4	<22	U/l
	Frauen	26 - 37,4	<17	U/l

Folgende Untersuchungen wurden durch das Krankenhauslabor in Gueckedou im Rahmen der stationären Diagnostik erstellt:

Hämoglobin:

Die Bestimmung des Hämoglobins erfolgte nach der Sahli-Methode.

Differentialblutbild:

Das Differentialblutbild wurde mikroskopisch im gefärbten Blutausstrich bestimmt.

Malariadiagnostik:

Eine Malaria-Infektion wurde mikroskopisch im „Dicken Tropfen“ diagnostiziert. Eine Differenzierung der Malariaerreger erfolgte nicht.

Liquor:

Die Untersuchung auf Zellen im Liquor erfolgte in einer Zählkammer, wobei die Zellen nicht in Granulozyten und Lymphozyten differenziert wurden. Bei erhöhter Zellzahl erfolgte eine Gramfärbung.

Parasitologische Stuhluntersuchung:

Nach Aufbereitung erfolgte die mikroskopische Untersuchung auf Wurmeier.

D ERGEBNISSE

D.1. Laborergebnisse

Insgesamt wurden die Seren von 62 Patienten aus Guinea sowie dem angrenzenden Liberia und Sierra Leone untersucht.

Dies erbrachte die folgenden Ergebnisse:

D.1.1 Indirekte Immunfluoreszenz IIF (IgG)

In der Indirekten Immunfluoreszenz konnten 55 Seren beurteilt werden:

Tabelle 1: Indirekte Immunfluoreszenz

Titer	Anzahl der Seren	Prozent (%)	Identifikation der pos. Seren
Summe neg.	47	85	u.a. LG 53
1/20	3		LG33, LG35, LG38
1/40	2		MSF3, MSF5
1/320	1		MSF1
1/640	1		LG30
1/1280	1		LG32
Summe pos.	8	15	

D.1.2 IgM-Elisa I und II

Im IgM-Elisa I und II konnten 62 Seren beurteilt werden (gleiche Ergebnisse):

Tabelle 2: IgM-Elisa

Ergebnis	Anzahl der Seren	Prozent (%)	Identifikation der pos. Seren
Summe pos.	4	6,45	LG30, LG32, LG48, LG55
Summe neg.	58	93,55	u.a. LG 53

D.1.3 IgG/IgM-Immunoblot und IgM-Immunoblot

Der auf der Basis rekombinant erzeugten Nukleoproteins basierende IgG/IgM-Immunoblot wurde mit dem Ziel entwickelt, einen einfach zu handhabenden Test zum Nachweis Lassa-spezifischer Antikörper zur Verfügung zu haben.

Zur Evaluierung von Spezifität und Sensitivität wurden unsere Ergebnisse in Beziehung zu der bisherigen Standardmethode, der Indirekten Immunfluoreszenz (IIF), gesetzt. Hierzu wurden Seren mit bekanntem IIF-Status von gesunden Personen aus Guinea und Liberia verwendet. Die IIF-negativen Seren wurden zusätzlich nach zwei Regionen in Guinea, nämlich Gueckedou mit einer hohen Seroprävalenzrate in der IIF (14 %) und die Region Pita mit einer niedrigen Seroprävalenzrate in der IIF (2,6 %) unterteilt.

Bei den Seren aus Deutschland handelt es sich um Seren von Patienten aus dem Bernhard-Nocht-Institut und um gesunde Blutspender.

Die nachfolgende Tabelle gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 3: Vergleich des IgG/IgM-Immunoblots mit der Indirekten Immunfluoreszenz

Anzahl der Seren aus den entsprechenden Regionen:

Immunoblot Ergebnis	IIF positiv		IIF negativ			
	Guinea	Liberia	Gueckedou	Pita	Liberia	Deutschland
positiv	68	9	108	12	8	1
negativ	7	3	189	190	79	243

D.1.3.1 Sensitivität

Im Vergleich zur Indirekten Immunfluoreszenz betrug die Sensitivität für Seren aus Guinea 90,7 % (68 / 75 Seren), für Seren aus Liberia 75 % (9 / 12) (p = 0,13; Fisher´s exact test).

D.1.3.2. Spezifität

Die Spezifität des IgG/IgM-Immunoblot gegenüber der Indirekten Immunfluoreszenz betrug für Seren aus der Region Gueckedou 63,6 % (189 / 297), für Seren aus der Region Pita 94,1 % (190 / 202) und für Seren aus Liberia 90,8 % (79 / 87). Von 244 Seren aus Deutschland war ein Serum schwach positiv (1+). Dies entspricht 0,4 %.

Die Antikörperprävalenz in der Indirekten Immunfluoreszenz beträgt, wie aus früheren Seroprävalenzstudien bekannt ist (ter Meulen et al., 1996), in der Region Pita 2,6 % und in der Region Gueckedou 14 %.

Für die IIF-negativen Seren aus Gueckedou und Pita ergaben sich im IgG/IgM-Immunoblot die nachfolgenden Ergebnisse:

Tabelle 4: Anteil der IIF-negativen Seren, die im IgG/IgM-Immunoblot positiv reagierten

Region	Anzahl der Seren	Prozent (%)	Seroprävalenz* in der IIF in %
Pita	12 / 202	5,9	2,6 [1)]
Gueckedou	108 / 297	36,4	14 [1)]

[1)] Seroprävalenz aus früheren Studien

IgG/IgM-Immunoblot

Im IgG/IgM-Immunoblot konnten 60 Seren beurteilt werden:

Tabelle 5: IgG/IgM-Immunoblot, Seren aus der Untersuchung in Gueckedou

Ergebnis	Anzahl der Seren	Prozent (%)	Identifikation der pos. Seren
Summe neg.	28	47,5	u.a.LG 53, MSF 5
schwach pos.	15		u.a.LG48, LG55
mittelgradig pos.	13		u.a.LG 32
stark pos.	3		LG29, LG30, MSF3
Summe pos.	31	52,5	

IgM-Immunoblot

Im IgM-Immunoblot konnten 55 Seren beurteilt werden:

Tabelle 6: IgM-Immunoblot, Seren aus der Untersuchung in Gueckedou

Ergebnis	Anzahl der Seren	Prozent (%)	Identifikation der Seren
Summe neg.	29	52,7	u.a. MSF5, LG53
schwach pos.	12		
mittelgradig pos.	10		u.a.LG32, LG48, LG55
stark pos.	4		LG 3, LG30, LG37, LG40/95
Summe positiv	26	47,3	

Tabelle 7: Vergleich IgM-Immunoblot zum IgM-Elisa I u. II

		IgM Immunoblot -	
		positiv	negativ
IgM-Elisa I u. II	positiv	4*	0
	negativ	9	42

* LG30, LG32, LG48, LG55

Die Sensitivität bezogen auf IgM-Elisa betrug 100 % (4 / 4), die

Spezifität 82,4 % (42 / 51).

D.1.4 RT- PCR

In der RT- PCR konnten 62 Seren getestet werden:

Tabelle 8: Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Ergebnis	Anzahl der Seren	Prozent (%)	Identifikation der pos. Seren
negativ	59	95,2	
positiv	3	4,8	LG32, LG53, MSF5

Anmerkung: Teile dieser Arbeit, die unter anderem den Immunoblot betreffen, wurden bereits veröffentlicht (ter Meulen et al., 1998). Dieser Veröffentlichung lagen positive PCR-Ergebnisse für 12 Patienten aus Guinea zugrunde. Allerdings ergab die Sequenzierung der PCR-Produkte, daß bis auf das PCR-Produkt, das auf dem Serum von Patient LG32 basierte, der sequenzierten Abschnitt mit dem als Positivkontrolle benutzten Stamm Josiah identisch war. Möglicherweise muss wie Bowen et al. schon vermutet haben, davon ausgegangen werden, daß es, z.B. im Bereich der Zykler, zu Kontaminationen mit der Positivkontrolle gekommen ist. Die erneute Untersuchung der Seren im Jahr 2002 mit einer verbesserten RT-PCR ergab negative Ergebnisse für die Josiah-identischen PCR-Proben, jedoch auch ein weiteres positives PCR-Ergebnis in einem zuvor negativ getesteten Serum (LG53, mündliche Mitteilung Dr. ter Meulen).

In dieser Arbeit wird daher abweichend von der oben angeführten Veröffentlichung nur von zwei akut infizierten Patienten (LG32, LG53) aus Guinea, sowie einem Patienten aus Sierra Leone (MSF5) ausgegangen. Die Aminosäure-Alignemente dieser Patienten, sowie zum Vergleich des Stamms Josiah, gibt die folgende Übersicht wieder:

Aminosäure-Alignement der N2/N4-PCR-Fragmente der Lassapatienten aus Gueckedou (LG32, LG53) und Sierra Leone (MSF5) im Vergleich mit dem Josiah-Stamm

Josiah QRRALLNMIGMSGGNQGARAGRDGVVRVWDVKNAELLNNQFGTMPSLT

MSF5 QRRALLNMIGMSGGNQGARAG**G**DGVVRVWDVKNAELLNNQFGTMPSLT

LG32 QRRALLNMIGMSGG**S**QGARA**AG**DGVVRVWDV**R**NAELLN**D**QFGTMPSLT

LG53 **H**RRA**F**LNMIGMSGG**G**QG**T**RAG**G**DGVVRVWDV**R**NAELLNNQFGTMPSLT

Die Unterschiede auf Aminosäurenebene im Vergleich zu Josiah betragen für

MSF5 1/48 = 2,1 %

LG32 5/48 = 10,4 %

LG53 6/48 = 12,5 %

D.2 Patientenkasuistiken

Um die Verbindung zwischen Laborbefunden und Klinik herzustellen, geschieht dieses in Form kurzer Kasuistiken.

Die folgenden Kasuistiken geben den klinischen Verlauf zweier Patienten mit einer akuten Lassavirus-Infektion (LG32, LG53) sowie von zwei Patienten mit abgelaufener Lassavirus-Infektion (LG30, LG55) wieder.

D.2.1 Kasuistik LG32

Am 18. August 1995 wurde ein 29jähriger Mann aufgenommen. Die Einweisungsdiagnose lautete Medikamentenintoxikation. Das klinische Bild entsprach einem Delirium mit akutem Verwirrtheitszustand.

Die Eigenanamnese war daher nur eingeschränkt möglich. Sie wurde durch Fremdanamnese ergänzt.

Es wurde angegeben, der Patient sei seit einer Woche fieberhaft erkrankt. Er war vor Aufnahme ambulant mit Ampicillin und Cotrimoxazol behandelt worden, ohne daß eine Besserung eintrat. Bei der Aufnahmeuntersuchung war der Patient delirant und daher nur eingeschränkt kooperativ. Er gab auf Befragen Kopf- und Brustschmerzen an.

An klinischen Zeichen fand sich eine Konjunktivitis. Hinweise auf eine Lähmung fanden sich nicht. Eine Rachenuntersuchung war wegen fehlender Kooperation nicht möglich, doch bestanden keine erkennbaren Beschwerden beim Schlucken. Die Auskultation ergab einen unauffälligen Befund. Blutungen bestanden nicht.

Der Patient hatte eine Temperatur von 38,5 °C, einen Puls von 100 Schlägen pro Minute. Der Blutdruck betrug 100/60 mmHg. An Laborparametern fanden sich ein Hämoglobin von 16,9 mg/dl, eine Leukozytose von 25.000 Zellen/mm^3 mit einem

Anteil von 29 % Segmentkernigen und 71 % Lymphozyten. Der Dicke Tropfen auf Malaria (keine weitere Differenzierung) war positiv.

Aufgrund der cerebralen Symptomatik und der Leukozytose wurde eine Lumbalpunktion gemacht. Diese ergab 59 Zellen/mm^3 (>10 Zellen/Gesichtsfeld). Die Gramfärbung war negativ.

Die Urinuntersuchung am 19.08. mittels Urinstix ergab:

Glukose	Protein	pH	Nitrit	Leukozyten	Erythrozyten
negativ	300 mg/dl	5	negativ	negativ	250 /µl

Eine Untersuchung auf Wurmeier wurde nicht durchgeführt.

Aufgrund des Malarianachweises wurde der Patient mit insgesamt 1,5 g Chloroquin (Dosis 600 mg Base, 1. und 2. Tag, 300 mg am 3. Tag) behandelt. Da aufgrund der erhöhten Liquorzellzahl eine Meningitis nicht ausgeschlossen werden konnte, erfolgte außerdem eine Behandlung mit Ampicillin 2 g alle 8 Stunden i.v., entsprechend einer Tagesdosis von 6 g. Außerdem erhielt der Patient eine orale Rehydratationslösung. Am nächsten Tag senkte sich die Temperatur auf 37,5 °C. Der Patient erschien klinisch gebessert und war deutlich geordneter. Die Behandlung wurde wie oben beschrieben fortgesetzt. Am dritten Tag nach Aufnahme lag die morgentliche Temperatur wieder bei 38,5 °C. Der Patient entwickelte plötzlich eine schwere Dyspnoe und verstarb unter dem klinischen Bild einer akuten respiratorischen Insuffizienz.

Die Serumuntersuchungen für Lassafieber in Hamburg ergaben:

IIF	IgM-Elisa I	IgM-Elisa II	IgG/IgM-Immunoblot	IgM-Immunoblot	PCR
1/1280	positiv	positiv	positiv (2+)	positiv (2+)	positiv

(2+) = mittelgradig positiv

Die Sequenzierung des PCR-Produktes ergab in Bezug auf den Josiah-Stamm Mutationen in 17 von 146 nt (11,6 %), was zu fünf Abweichungen (10,4 %) auf der Ebene der Aminosäuren führte.

D.2.2 Kasuistik LG53

Am 2. Juli 1996 wurde eine 38 Jahre alte Frau ambulant im Krankenhaus Gueckedou behandelt.

Die Patientin gab an, seit ca 10 Tagen erkrankt zu sein. Die Erkrankung hatte mit Fieber und Halsschmerzen abrupt begonnen. Bei der Vorstellung gab sie Kopf-, Hals- und Gelenkschmerzen an. Außerdem klagte Sie über Schwindel, Schlafstörungen, Schluckstörungen und gab an, einmalig blutig erbrochen zu haben.

Die Untersuchung ergab Fieber von 38°C. Der Blutdruck betrug 100/60 mm Hg, der Puls war auf 108 Schläge pro Minute beschleunigt. Es bestand eine Pharyngitis und eine Konjunktivitis. Die Untersuchung der Lunge, des Abdomens sowie die neurologische Untersuchung ergaben keinen pathologischen Befund.

In den Laboruntersuchungen fanden sich 8050 Leukozythen/mm^3 mit einem Anteil von 57 % Segmentkernigen, 38 % Lymphozythen, 4 % Eosinophilen und 1% Monozythen.

Eine Untersuchung auf Malariaparasiten wurde nicht durchgeführt.

Die am 02.07 durchgeführte Urinuntersuchung mittels Urinstix ergab:

Glukose	Protein	pH	Nitrit	Leukozyten	Erythrozyten
negativ	100 mg/dl	5	negativ	negativ	250 /µl

Die Bestimmung der Transaminasen in Hamburg ergaben eine AST von 54,2 U/l und eine ALT von 413 U/l.

Bei insgesamt relativ gutem Allgemeinzustand wurde die Patientin unter der klinischen Diagnose einer schweren Pharyngitis mit Gelenkbeschwerden mit einer Medikation mit Amoxicillin und Paracetamol behandelt und wieder entlassen. Informationen über den weiteren Verlauf bestehen nicht.

Die Serumuntersuchungen für Lassafieber in Hamburg ergaben:

IIF	IgM-Elisa I	IgM-Elisa II	IgG/IgM-Immunoblot	IgM-Immunoblot	PCR
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv

Die Sequenzierung des PCR-Produktes ergab in Bezug auf den Josiah-Stamm Mutationen in 17 von 146 nt (11,6 %), was zu sechs Abweichungen (12,5 %) auf der Ebene der Aminosäuren führte.

D.2.3 Kasuistik LG30

Am 31. Juli 1995 wurde eine 26 Jahre alte Frau aufgenommen. Sie gab an, seit dem 29. Juli erkrankt zu sein. An Symptomen klagte sie über Schwindel, Kopfschmerzen, Halsschmerzen sowie allgemeine Schwäche.

Die Untersuchung ergab Fieber von 38 °C, eine Pharyngitis sowie eine Konjunktivitis. Ansonsten bestand ein leichter Tremor der Hände.

An Laborergebnissen fand sich ein Hämoglobin von 10 g/dl, die Leukozytenzahl betrug 4.700 Zellen/mm^3.

Die Untersuchung auf Malaria war negativ, ebenso die Untersuchung auf Wurmeier im Stuhl.

Die Patientin wurde ohne spezifische Behandlung beobachtet.

Am Tag nach der Aufnahme entfieberte sie und wurde am vierten Tag entlassen.

Die Serumuntersuchungen für Lassafieber in Hamburg ergaben:

IIF	IgM-Elisa I	IgM-Elisa II	IgG/IgM-Immunoblot	IgM-Immunoblot	PCR
1/640	positiv	positiv	stark positiv	stark positiv	negativ

D.2.4 Kasuistik LG55

Am 11. Juli wurde eine 23jährige Patientin aufgenommen. Sie gab an, seit ca. vier Wochen allmählich mit Fieber und Erbrechen erkrankt zu sein.

Bei der Untersuchung am 16. Juli gab die Patientin an, etwas trockenen Husten, Schmerzen in Hals, Abdomen sowie in den Schultern zu haben.

Außerdem bestanden Schwindel, Singultus und Tinnitus nach ambulanter Chinineinnahme. Die Patientin berichtete über eine Blutung am rechten Auge.

Die Untersuchung ergab eine Konjunktivitis und Pharyngitis sowie abdominellen Druckschmerz. Es bestand ein endgradiger Meningismus sowie Schlafstörungen.

Die Laboruntersuchungen ergaben ein Hämoglobin von 11,5 g/dl (15.07.), Leukozyten von 3.600 mm^3, sowie im Differentialblutbild 37 % Segmentkernige, 60 % Lymphozyten, 3 % Eosinophile.

Die Untersuchung auf Malaria war zweifach negativ (11.7., 15.07.). Die Stuhluntersuchung ergab Eier von Ascaris und Schistosoma mansoni.

Die ambulant begonnene Behandlung mit Chinin wurde fortgesetzt. Wegen des fortbestehenden Fiebers erfolgte ab dem fünften Tag eine Behandlung mit Amoxicillin. Die Wurmerkrankung wurden mit Mebendazol und Praziquantel behandelt.

Die Temperaturen schwankten im Beobachtungszeitraum vom vom 11.07. bis 16.07. zwischen 37 °C und 38 °C. Der Ausgang der Erkrankung ist mir wegen meiner Abreise nicht bekannt.

Die Serumuntersuchungen für Lassafieber in Hamburg ergaben:

IIF	IgM-Elisa I	IgM-Elisa II	IgG/IgM-Immunoblot	IgM-Immunoblot	PCR
unspezifisch	positiv	positiv	leichtgradig positiv	mittelgradig positiv	negativ

E. DISKUSSION

E.1 IgG/IgM-Immunoblot

Der auf der Basis rekombinant erzeugter Nukleoproteine basierende IgG/IgM-Immunoblot wurde mit dem Ziel entwickelt, einen einfach zu handhabenden Test zum Nachweis Lassavirus-spezifischer Antikörper zu haben. Vergleichbare Teste auf der Basis rekombinant erzeugter Virusproteine wurden in der Vergangenheit von anderen Untersuchern schon erfolgreich für den Nachweis von Krim-Kongo- und Hantavirusinfektionen erprobt (Marriot et al., 1994; Hjelle et al., 1997).
Unsere Ergebnisse wurden in Beziehung zu der bisherigen Standardmethode zum Nachweis Lassavirus-spezifischer Antikörper, der Indirekten Immunfluoreszenz, gesetzt. Hierzu wurden Seren mit bekanntem IIF-Status aus Guinea und Liberia verwendet. Die IIF-negativen Seren wurden zusätzlich noch nach zwei Regionen in Guinea, nämlich Gueckedou mit einer hohen Seroprävalenzrate in der Indirekten Immunfluorezenz (14 %) und die Region Pita mit einer niedrigen Seroprävalenzrate in der Indirekten Immunfluoreszenz (2,6 %) unterteilt.

E.1.1 Sensitivität des IgG/IgM-Immunoblots

Vorversuche mit Verwendung des rekombinanten Nukleoproteins in einem Elisa hatten trotz eines längeren Renaturierungsprozesses nur zu einer geringen Sensitivität von ca. 30 % geführt. Durch Einsatz großer Mengen des denaturierten Proteins bis 1µg im IgG/IgM-Immunoblot ließ sich die Sensitivität des IgG/IgM-Immunoblots zum Nachweis Lassavirus-spezifischer Antikörper für Seren aus Guinea auf 90,7 %, für Seren aus Liberia auf 75 % gemessen an der Indirekten

Immunfluoreszenz steigern. Dies zeigte, daß Antikörper gegen lineare Epitope in einer überwiegenden Anzahl der Seren vorhanden waren.

9,3 % der IIF-positiven Seren aus Guinea und 25 % der IIF-positiven Seren aus Liberia wurden im IgG/IgM-Immunoblot nicht erkannt. Dies war nicht von der Titerhöhe abhängig. Sowohl Seren mit einer IIF-Titerhöhe von 1/40 als auch Seren mit einer Titerhöhe von 1/160 waren im IgG/IgM-Immunoblot negativ.

Hierfür kommen mehrere mögliche Erklärungen in Betracht: Der IgG/IgM-Immunoblot verwendet ein Nukleoprotein, dem der N-Terminus fehlt. Antikörper die gegen diesen Bereich gerichtet sind, entgehen dem Test.

Außerdem wird das Nukleoprotein durch die Aufbereitung für den Immunoblot weitestgehend denaturiert. Nur die gegen lineare Epitope gerichteten Antikörper sind noch in der Lage mit dem Nukleoprotein zu reagieren.

Das dritte Problem könnten Virusvarianten mit entsprechender Varianz der gegen sie gerichteten Antikörper sein. Virusvarianten wurden bei früheren Untersuchungen in Liberia entdeckt. Auch in unseren Untersuchungen wurden drei Virusvarianten gefunden (LG32, LG53, MSF5). Sie unterscheiden sich auf der Aminosäureebene vom Josiah-Stamm. Während die Indirekte Immunfluoreszenz das ganze Virus als Antigen verwendet, wobei die Anzahl der antigenen Strukturen NP, GP1, GP2 deutlich höher ist, können sich z.B. Variationen im Bereich des im Immunoblots verwendeten NP-Abschnitts stärker auswirken. Die geringere Sensitivität in Seren aus Liberia könnte hierdurch begründet sein. Außerdem waren die Seren aus Liberia mit bis zu 15 Jahren Lagerungsdauer deutlich älter und es ist nicht genau bekannt, wie oft sie möglicherweise bereits aufgetaut und wieder eingefroren wurden, so daß Verluste von Antikörpern auch hierdurch bedingt sein könnten.

Aufgrund der vorstehenden Überlegungen wäre eine Verbesserung der Spezifität durch folgende Modifikation möglich: Anstelle der alleinigen Verwendung des Nukleoproteins aus Lassavirus Josiah-Stamm könnten weitere rekombinant erzeugte Nukleoproteine von Virusvarianten wie z.B. der in unseren Untersuchungen gefundene Stamm LG32 verwendet werden.

E.1.2 Spezifität des IgG/IgM-Immunoblots

Die Spezifität des IgG/IgM-Immunoblots gegenüber der Indirekten Immunfluoreszenz betrug für Seren aus Gueckedou 63,6 %, aus der Region Pita 94,1 % und für Seren aus Liberia 90,8 %.

Von den IIF-negativen Seren, getrennt nach Regionen, fanden sich im IgG/IgM-Immunoblot positive Ergebnisse bei 5,9 % der Seren aus der Region Pita und 36,4 % aus der Region Gueckedou. Dies entspricht in beiden Fällen etwa dem zweifachen der in der Indirekten Immunfluoreszenz gefundenen Seroprävalenz.

Für die Indirekte Immunfluoreszenz werden als Cut-off Serumtiter $\leq$ 1/16 zur Vermeidung falsch positiver Befunde empfohlen. Diese Verbesserung der Spezifität führt möglicherweise durch Senkung der Sensitivität zu einer Unterschätzung der Antikörperprävalenz (McCormick et al., 1987a).

Gemessen am durchgeführten IgG/IgM-Immunoblot ergeben sich die oben angeführten höheren Seroprävalenzen.

Es wäre auch denkbar, daß in dem untersuchten Gebiet weitere bislang nicht bekannte antigenverwandte humanpathogene Viren vorkommen, die ohne schweres Krankheitsbild, jedoch mit einer Immunantwort einhergehen (McCormick et al., 1987a). Die so gebildeten Antikörper könnten im Immunoblot durchaus gleiche Strukturen auf Ebene der linearen Epitope erkennen, die bei

Verwendung des ganzen Virus als Antigen durch die Tertiärstruktur nicht zugänglich sind. Dies könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen.
Ein Serum in der Kontrollgruppe aus Deutschland zeigte eine schwach positive Reaktion. Präabsorption des Serums mit einen Lysat aus nichttransformierten E. coli führten zum Ausbleiben dieser Reaktion. Trotz Aufreinigung des Nukleoproteins scheinen Spuren des Antigens von E. coli auf den Immunoblot-Streifen zu gelangen und zu einer Reaktion mit Antikörpern gegen E. coli zu führen. Dies bedeutet, daß die Aufreinigung des Nukleoproteins weiterer Verbesserungen bedarf.

E.2 IgM-Immunoblot

Zum Vergleich mit dem IgM-Immunoblot steht der IgM-Elisa auf der Basis monoklonaler Antikörper und polyklonale Antikörper aus der Maus zur Verfügung. Gemessen am IgM-Elisa betrug die Sensitivität 100 %, die Spezifität 82,4 %. Es wäre denkbar, daß durch eine höhere Sensitivität des Tests im Vergleich zum IgM-Elisa, IgM-Antikörper länger nachweisbar bleiben. Solche Unterschiede sind für andere IgM-Tests (IIF/Elisa) bereits bekannt. So waren Antikörper vom Typ IgM in der Indirekten Immunfluoreszenz 4 bis 16 Wochen, im Elisa bis zu 18 Monate nachweisbar (Wulff et Johnson, 1979; Niklasson et al., 1984).
Von den vier im IgM-Elisa positiv reagierenden Seren konnte nur aus einem Serum (LG32) auf Grund des PCR-Ergebnisses auf eine akute Infektion geschlossen werden. Ein weiteres Serum (LG30) wies hohe Titer in der IIF auf und reagierte auch im IgM-Immunoblot und IgG/M-Immunoblot positiv beziehungsweise stark positiv. Hierbei könnte es sich um eine kürzlich abgelaufene Infektion, eventuell auch Reinfektion gehandelt haben. Bei den

beiden weiteren Seren (LG48, LG55), die beide ebenfalls in der PCR negativ waren fällt auf, daß sie in der IIF nur unspezifisch, beziehungsweise negativ reagierten, während sie in den Immunoblots positiv waren. Hier kann nur spekuliert werden, daß die Sensitivität der Immunoblots aber auch des IgM-Elisa über der der verwendeten IIF liegt.

Von den übrigen 51 Seren waren neun Seren im IgM-Immunoblot positiv, im IgM-Elisa jedoch negativ. Drei wiesen niedrige Indirekte Immunfluoreszenz-Titer (1:20 bis 1:40) auf. Die übrigen sechs waren in der Indirekten Immunfluoreszenz (IgG) negativ. Ob es sich bei diesen neun positiv getesteten Seren um falsch positive Befunde oder um eine höhere Empfindlichkeit des IgM-Immunoblots gegenüber dem Elisa handelt, kann nicht sicher enschieden werden. Dies hätte sich an Verlaufsseren von Patienten nach Lassavirus-Infektionen klären lassen können, die jedoch nicht zur Verfügung standen.

Der Anteil der im IgM-Immunoblot positiven Seren von 13 / 55 (= 23,6 %) erscheint, angesichts einer Seroprävalenz von 14 % in der Indirekten Immunfluoreszenz, hoch. Legt man jedoch die Daten aus dem IgG/IgM-Immunoblot mit einer Seroprävalenz von 45,3 % zugrunde und geht man von einer langen Persistenz der IgM-Antikörper aus, scheint ein so hoher Prozentsatz denkbar.

Allerdings bedeutet die schon bekannte lange Persistenz von IgM-Antikörpern in einem IgM-Elisa von bis zu anderthalb Jahren (Niklasson et al., 1984), daß der Nachweis von IgM bei Patienten im Endemiegebiet keineswegs auf eine akute Lassavirus-Infektion schließen läßt. Bei Personen, die sich nur kurz im Endemiegebiet aufhielten, würde ein positiver IgM-Nachweis hingegen auf eine akute Infektion hinweisen.

Bei zwei Seren (LG53, MSF5) waren trotz positivem RT-PCR-Resultats und niedrigtitrigem Befund in der Indirekten Immunfluoreszenz (1/40)(nur MSF5) die Untersuchung auf IgM (IgM-Elisa, IgM-Immunoblot) negativ. Das unterstreicht, daß ein negatives IgM-Resultat eine akute Lassavirus-Infektion nicht sicher ausschließt. Das Fehlen Lassa-spezifischer Antikörper bei ca 12 % der Patienten mit gesicherter Lassavirus-Infektion haben auch Bausch et al. bei ihren Untersuchungen in Sierra Leone und Guinea festgestellt.

Auch bei Untersuchungen im Rahmen einer importierten Lassavirus-Erkrankung konnte keine meßbare Antikörperantwort festgestellt werden (Fleischer et al., 2000).

E.3 Kritische Würdigung der publizierten grundlegenden Lassavirus-Studien

Wesentliche Kenntnisse über die Erkrankung mit Lassafieber in Westafrika gehen auf drei Arbeiten von McCormick und Mitarbeitern Mitte der 80er Jahre in Sierra Leone zurück (McCormick et al., 1987a und 1987b; Johnson et al., 1987).

Da diese Arbeiten bis heute weitgehend das Bild von der Klinik und dem Ausmaß der Erkrankung in Westafrika bestimmen, sollen wesentliche Punkte hier wiedergegeben und soweit möglich, eigenen Erfahrungen und Ergebnissen gegenübergestellt werden:

Aus der prospektiven Studie zur Epidemiologie und Ökologie des Lassafiebers (McCormick et al., 1987a) ergibt sich, daß die Seroprävalenzen, gemessen durch die Indirekte Immunfluoreszenz in Sierra Leone in der Dorfbevölkerung zwischen 8 und 52 % liegen. Mit der gleichen Methode (IIF) fanden sich in Guinea für die Region Gueckedou eine Seroprävalenz von 14 %. Mit dem IgG/IgM-Immunoblot

ergab sich deutlich höhere Seroprävalenz von 45,3 % für die Region Gueckedou (vgl. Tab. 5, S.37).

Aus Verlaufsstudien ergaben sich Serokonversionraten von 5 bis 22 % pro Jahr. Die Häufigkeit einer febrilen Episode, die mit einer Serokonversion einherging, lag bei 5 bis 14 %. Dies bedeutet, daß in der Dorfbevölkerung die Wahrscheinlichkeit, einen mindestens vierfachen Serumtiteranstieg für Lassa-spezifisches IgG während einer Fieberepisode zu haben, bei 5 bis 14 % lag. Dabei wurde die Ursache des Fiebers differentialdiagnostisch nicht weiter untersucht.

Solche Serokonversionen wurden mit durchgemachten Infektionen, eventuell auch Reinfektionen, gleichgesetzt.

Bei Patienten mit nachgewiesenen Antikörpern ließen sich im Rahmen von Wiederholungsuntersuchungen bei 1 bis 18 % der Untersuchten bis zu achtfache Titeranstiege feststellen. Die Höhe der Titeranstiege wurde als Hinweis auf eine Reinfektionen gedeutet. Auch die Möglichkeit einer Infektion mit einem antigenverwandten Virus wurde in Erwägung gezogen (Mc Cormick et al., 1987a).

Interessant war auch, daß in einer untersuchten Population die Serokonversionsrate bei 6,6 % pro Jahr und die Seroreversionsrate, als Ausdruck der Rückbildung meßbarer Antikörpertiter, in der gleichen Größenordnung bei 6,4 % pro Jahr lag (McCormick et al., 1987a). Auch dies wurde, zusammen mit den hohen Seroprävalenzen, als Hinweis auf eine Reinfektionen gedeutet: „In this study we found that people with existing antibody may experience an increase in titer, an observation suggesting that they have been reinfected or infected with an antigenically relatet virus. More importantly, we found a rate of seroreversions of 6,4 per 100 antibody-positiv persons per year in our five-year study. Thus it is likely that some, or perhaps many, persons experiencing „seroconversions“ are in fact

undergoing reinfection and that such reinfections may not produce illness. This may be the most important explanation for the large proportion of asymtomatic infections seen in our prospective studies. Primary infections may therefore result in a much higher rate of illness“ (McCormick et al., 1987a, S. 443). Allerdings haben diese Überlegungen keine Berücksichtigung bei der Falldefinition späterer klinischer Studien gefunden, bei denen auch IgG-Serokonversionen als definierend für eine akute Lassavirus-Infektion genommen wurden.

Ein Virusnachweis wurde nur in einer kleinen Gruppe von Personen im Dorf mit Fieber durchgeführt. Immerhin hatten zwei von 58 nicht hospitalisierten Personen einen positiven Virusnachweis im Blut (entspricht ca. 3,5 %). Zusammenfassend läßt sich zu der Studie von Mc Cormick et al. (1987a) folgendes festhalten:

Per definitionem wird in dieser Untersuchung ein mindestens vierfacher Titeranstieg für Lassa-spezifische Antikörper mit einer Infektion durch Lassavirus gleichgesetzt. Aufgrund der teilweise hohen Titeranstiege bei seropositiven Personen und der hohen Seroreversionsrate werden aber auch Reinfektionen mit Lassavirus oder das Vorkommen mit Lassavirus-antigenverwandten Viren für möglich gehalten. Bemerkenswert ist auch der Virusnachweis bei zwei von 58 nicht hospitalisierten Personen mit Fieber.

Die beiden Studien „Clinical Virology of Lassa Fever in Hospitalized Patients“ (Johnson et al., 1987) und „A Case-control Study of the Clinical Diagnosis and Course of Lassa Fever“ (McCormick et al., 1987b) basieren auf den Untersuchungen in zwei Krankenhäusern im östlichen Sierra Leone über einen Zeitraum von drei Jahren. In beiden Untersuchungen zur klinischen Symptomatik des Lassafiebers erfolgt die Diagnose eines Lassafiebers nach folgender Falldefinition („case definition“):

Fieber ≥ 38 °C **und** eines oder mehrere der folgenden Kriterien:

1. Virusnachweis
2. Serokonversion von Titern < 1/4 auf ≥ 1/16 in der Indirekten Immunofluoreszenz oder
3. IgG-Titer (IIF) ≥ 1/256 und Nachweis von IgM-Antikörpern

(Johnson et al., 1987; McCormick et al., 1987b, S.446).

Gemäß dieser Falldefinition wurden 392 Lassafieberpatienten unter 648 Patienten mit Fieber (ca. 60%) identifiziert (Johnson et al., 1987). Leider gibt die Studie nicht an, welche Anzahl von Patienten durch welche der vorgenannten Methoden identifiziert wurden. Aus der Aussage, daß eine Virämie fast nie nach Aufnahme im Krankenhaus begann („From serially obtained samples, we found that viremia almost never commenced after admission to the hopital...“ Johnson et al., 1987, S. 458“) und Tabelle 2 (Johnson et al., 1987, S. 459), die 110 viruspositive Proben bei Aufnahme nennt, kann geschlossen werden, daß bei ca. 30 % (110 / 392) der Patienten die Diagnose Lassafieber durch Virusnachweis, bei den übrigen ca. 70 % durch die oben beschriebenen Antikörpernachweise erfolgte.

Ca. 11 % der Patienten mit Lassafieber entwickelten keine Antikörper bis zum Tag 18 nach Symptombeginn. Aber auch rapide Antikörperanstiege für IgG von negativem Antikörpernachweis auf Titerhöhen von 1/1024 innerhalb von ein bis zwei Tagen wurden gefunden.

Aufgrund der Untersuchungen wurden unter anderem die Schlußfolgerungen gezogen, daß 2/3 aller akuten Lassafieberinfektionen durch positiven IgM-Nachweis bei Aufnahme identifiziert werden könnten. Bezüglich der prognostischen Faktoren „Virämie“ und „Höhe des AST- Spiegels“ sei auf die Einleitung verwiesen.

Die dritte Studie: „A Case-control Study of the Clinical Diagnosis and Course of Lassa Fever“ (McCormick et al., 1987b) ergab 441 Lassafieberfälle auf 1087 Patienten mit Fieber (entspricht ca. 40 %) mit einer Sterberate von 16,5 %, wobei nur schwerkranke Patienten im Krankenhaus aufgenommen wurden. Die Studie erwähnt ausdrücklich, daß eine Differentialdiagnose nicht möglich war („...indeed, our study also has limitations in that laboratory confirmation of etiology diagnosis of our non lassa fever (control) patients was not possible“).

Die Diagnose Lassafieber wurde allein aufgrund der positiven Kriterien gemäß der Falldefinitionen (s.o.) getroffen und differentialdiagnostisch in Frage kommende Erkrankungen verworfen („We have seen patients with many different diagnoses, such as pneumonia, typhoid fever, gastroenteritis, abdominal infection, and even urinary tract infection, who were ultimately shown to have Lassa fever.“).

Die von Johnson et al. (1987) und McCormick et al. (1987b) vorgelegten Studien werfen verschiedene Fragen auf:

- Ist ein so hoher Anteil akuter Lassavirus-Infektionen von 40 bzw. 60 % aller fieberkranken Patienten plausibel?
- Identifiziert eine Untersuchung gemäß der Falldefinition (Virusnachweis, IgG-Titeranstieg, Nachweis von IgG und IgM) korrekt akute Lassafiebererkrankungen?

E.3.1 Virusnachweis

Ca. 30 % der Fälle wurden durch Virusnachweis identifiziert. Der Virusnachweis ist der „Goldstandard“ in der virologischen Diagnostik. Der Nachweis eines Virus, sofern es sich um ein pathoges Virus handelt, beweist eine Infektion: Nur grundsätzlich sei darauf hingeweisen, daß eventuell bestehende Symptome eines

Patienten nicht zwangsläufig auf die Infektion zurückzuführen sind. Als Beispiel sei ein Patient mit einer chronischen Hepatitis B genannt, der eine Pneumonie erleidet. Dies ist in sofern bedeutungsvoll, als das klinische Bild der Lassavirus-Infektion zum Teil auf statistischen Auswertungen der Symptome bei laborchemisch nachgewiesener Lassavirus-Infektion beruht, differentialdiagnostisch in Frage kommende Erkrankungen, die für die klinische Symptomatik mit verantwortlich sein könnten, jedoch nicht ausgeschlossen wurden.

Daß der Virusnachweis allein nicht mit einem schweren Krankheitsverlauf einhergeht, sondern dieser maßgeblich von der Viruslast abhängt, hat die Studie von Johnson et al. (1987) gezeigt. Auch der Nachweis von Virus bei 2 von 58 Patienten mit Fieber in einem Dorf (McCormick et al., 1987a) unterstreicht dies. Bei Studien in den USA oder Europa würde bei ähnlicher Fragestellung auch bei positivem Virusnachweis mit Sicherheit dem Ausschluß differentialdiagnostisch in Frage kommender Erkrankungen eine hohe Bedeutung beigemessen werden (Frame et al., 1970). Daß dies in den vorliegenden Studien unterblieb, ist unter dem Gesichtspunkt des damit weiter erhöhten logistischen Aufwands verständlich, hätte in der Diskussion jedoch einen weiteren Rahmen verdient.

Die für den Virusnachweis gemachten Aussagen lassen sich in ähnlicher Form auf die PCR übertragen, die in vielen Bereichen bereits den direkten Erregernachweis ersetzt hat. Allerdings ergeben sich in Abhängigkeit von den gewählten RNA-Abschnitten bzw. Primern teilweise sehr große Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität in Bezug auf den direkten Virusnachweis in der Kultur (Trappier et al., 1993; Demby et al., 1994). Auch stellt die Kontaminationsmöglichkeit durch PCR-Produkte im Bereich der Zykler, wie sie

vermutlich auch im Verlauf der vorliegenden Untersuchung aufgetreten sind, hohe Anforderungen an den Untersucher (vgl. Anmerkung unter D.1.4 RT-PCR, S.39). Aus Impfstudien an Primaten ist bekannt, daß sich Virusmaterial auch noch nach 120 Tagen in zahlreichen Organen nachweisen ließ (Fischer-Hoch, persönliche Kommunikation). Ein langzeitiger Nachweis durch eine sensitive PCR erscheint daher auch aus dem Blut denkbar. Ein möglicher Nachweis durch die PCR mit einem solchen Abstand zur akuten Infektion würde jedoch den Wert der PCR zur Identifizierung akuter Lassavirus-Infektionen im Endemiegebiet stark einschränken. Hier wären Verlaufsuntersuchungen bei Patienten nach durchgemachter, durch Virusnachweis bestätigter Erkrankung zur Klärung dieser Frage sinnvoll.

Derzeit wird, wie auch in der vorgelegten Arbeit, ein positiver Nachweis von Teilen der Lassavirus-RNA durch eine RT-PCR mit einer akuten Infektion gleichgesetzt.

E.3.2 IgG-Serokonversionen

Serokonversionen, wie sie in der Falldefinition in Verbindung mit Fieber als ein Marker für eine akute Erkrankung verwendet werden, sind im Endemiegebiet bei der Dorfbevölkerung ein häufiges Geschehen. Vor dem Hintergrund von Seroprävalenzen von bis zu 52 %, Serokonversionsraten bis zu 22 % pro Jahr, bzw. Serokonversionen während einer febrilen Phase von bis zu 14 % in der Dorfbevölkerung (McCormick et al., 1987a) scheint dieses Kriterium problematisch.

Aufgrund der fehlenden differentialdiagnostischen Untersuchungen kann auch bei den Untersuchungen in der Dorfbevölkerung das Fieber nicht sicher als Symptom einer Lassavirus-Infektion gewertet werden. Vielleicht wurde den Patienten

deshalb neben Aspirin auch immer eine Chloroquinbehandlung angeboten (McCormick et al., 1987a).

Negative IgG-Titer belegen auch nicht, daß der Patient zuvor keinen Kontakt mit dem Lassavirus hatte. Die Case control-Studie (McCormick et al., 1987a) zeigte, wie oben dargestellt, auch hohe Seroreversionsraten von über 6 % pro Jahr. Die Möglichkeit von Reinfektionen bzw. Infektionen mit einem antigenverwandten Virus wird daher als wichtiges Ergebnis der Studie herausgestellt. Eine Serokonversion (IgG) ohne Virusnachweis erscheint daher ein problematischer Indikator für eine akute Lassavirus-Infektion. Auf die Problematik, eine akute Lassavirus-Infektion anhand von IgG-Anstiegen zu definieren, weist auch die Studie von Bausch et al. hin und stellt Überlegungen an, solche Titerbewegungen sogar zum Ausschluß akuter Infektionen zu benutzen: „Thus, the presence of Elisa IgG antibody confirms previous exposure to Lassa virus and, conversely, can be used to exclude acute infection if found in high titer early in the course of illness“ (S. 2673).

Auch die beschriebenen rapiden Antikörperanstiege innerhalb von ein bis zwei Tagen sprechen daher eher für eine Boosterung durch eine Reinfektion als für eine Erstinfektion. Eventuell könnte durch Aviditätsmessungen zwischen neu erworbenen Antikörpern und Antiköperanstiegen als Folge einer Reinfektion im Sinne einer Boosterung unterschieden werden, wie dies für andere Viruserkrankungen möglich ist (Kangro et al., 1991; Ward et al., 1993; Hedman et Rousseau, 1989).

E.3.3 IgM-Nachweis

Der IgM-Nachweis ist für viele bakterielle und virale Erkrankungen ein guter Parameter zum Nachweis einer akuten Infektion. Zur Beurteilung eines IgM-Titers

sind Kenntnisse bezüglich seiner Kinetik und insbesondere seiner Persistenz über längere Zeiträume erforderlich. Laut Johnson et al., 1987 fanden sich bei ca.zwei Drittel der Patienten, die als Lassavirus-infiziert identifiziert wurden, im Aufnahmeserum IgM-Antikörper. Dies wird als wichtiger Hinweis darauf gewertet, daß zwei Drittel aller Lassapatienten allein durch IgM-Bestimmung im Aufnahmeserum identifiziert werden könnten. Der hohe Anteil von IgM-positiven Lassafieber-Patienten erstaunt jedoch weniger, wenn man sich vor Augen führt, daß ein positiver IgM-Nachweis ein Bestandteil im Rahmen der Falldefinition ist und damit zur Diagnose „Lassafieber-Patient“ führt.

Auf die Kinetik von IgM wird in der Arbeit zur Seroprävalenz nicht eingegangen. Daher muß auf andere Untersuchungen zurückgegriffen werden. Diese zeigen eine Persistenz von IgM in einem IgM-Elisa bis zu anderthalb Jahren (Niklasson et al., 1984).

Dies schließt eine Verwendung eines IgM-Titers bei Aufnahme als beweisenden diagnostischen Indikator für eine akute Infektion bei Patienten im Endemiegebiet aus. Dennoch wird auch in einer neueren Studie der Versuch unternommen, an durch Virusisolation bestätigten Lassavirusfällen die diagnostische Wertigkeit des IgM-Nachweises in einem IgM-Elisa zur Identifizierung akuter Lassavirus-Infektionen zu belegen. Durch IgM-Nachweis (Elisa) konnten 36 von 50 (72 %) bestätigter Lassavirus-Erkrankungen erkannt werden.

Allerdings waren auch 23 / 255 Patienten (9 %) falsch positiv (Bausch et al., 2000). In der Diskussion wird der Frage, ob die IgM-Ergebnisse falsch positiv sind oder ob aufgrund des fortgeschrittenen Krankheitsverlaufs die Phase der Virämie bereits vorüber war, ausführlich diskutiert. Davon, daß diese Überlegungen richtig sind, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgegangen werden. Nur über den

Zeitraum, wie lange die Virämie zurückliegt, sind keine Aussagen möglich, da die Studie keine Untersuchungsergebnisse bezüglich der Persistenz der im untersuchten IgM-Elisa gefundenen Antikörper aufweist. Die Infektion könnte daher auch bereits Monate zurückliegen und für den aktuellen Krankenhausaufenthalt unerheblich sein.

Zur Klärung der Frage, in wieweit IgM-Titeranstiege bzw. Serokonversionen als Hinweis auf eine akute Infektion gedeutet werden können, wären ähnliche Untersuchungen erforderlich, wie sie von McCormick et al. (1987a) in „A Prospective Study of the Epidemiology and Ecology of Lassa Fever“ für IgG-Serokonversionen und Seroreversionen durchgeführt wurden.

Es sei noch hinzugefügt, daß das Nichtauftreten von Antikörpern (IgG, IgM) eine Lassavirus-Infektion nicht ausschließt. Bei 11 % der Lassafieber-Patienten in der Studie aus Sierra Leone (Johnson et al., 1987) entwickelten sich bis zum 18. Tag nach Krankheitsbeginn keine Antikörper. In ähnlicher Höhe (12 %) bewegt sich auch der Anteil Antikörper-negativer Lassafieber-Patienten in der Studie von Bausch et al. (2000). Von den beiden Lassafieber-Patienten aus Gueckedou hatte einer (LG53) zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Antikörper. Auch bei der Patientin, die im Jahr 2000 mit einer durch PCR und Virusanzucht identifizierten Lassavirus-Infektion in der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg behandelt wurde, konnten im Krankheitsverlauf weder IgG- noch IgM-Antikörper nachgewiesen werden (Fleischer et al., 2000).

E.4 Interpretation der eigenen klinischen und virologischen Untersuchungen

Bei den eigenen Untersuchungen im Krankenhaus Gueckedou fand sich durch Untersuchung von 55 Seren bei zwei Patienten (LG32, LG53) eine akute

Lassavirus-Infektion (3,6 %). Dies bewegt sich in einer ähnlicher Größenordnung, wie sie von Bausch et al. (2000) in Guinea gefunden wurde (7 / 224 Patienten entspricht 3,1 %).

Bei dem ersten Patienten ergab sich fremdanamnestisch ein Krankheitsbeginn eine Woche vor Aufnahme. Der Patient verstarb am dritten stationären Tag. Bei Aufnahme bestand bereits ein fortgeschrittenes delirant agitiertes Krankheitsbild. Die erhöhte Liquorzellzahl weist auf eine mögliche direkte zerebrale Infektion durch das Lassavirus oder auf eine mögliche Schädigung durch einen Lassavirus-induzierten Immunprozess hin (Solbrig et McCormick, 1991). Hinweise auf eine bakterielle Meningitis fanden sich, allerdings nach ambulant begonnener, antibiotischer Therapie in der Gramfärbung nicht. Die übrigen Krankheitssymptome sind unspezifisch: Cephalgie und Fieber hätten auch als Zeichen der nachgewiesenen Malaria gedeutet werden können. Letztlich bewegen sich die Symptome des Patienten in dem Rahmen der für eine Lassavirus-Infektion beschriebenen vielfältigen Symptomatik.

Die Behandlung orientierte sich an möglichen Ursachen des Krankheitsbildes (Meningitis) sowie an der nachgewiesenen Malariaerkrankung.

Von einer gesicherten Lassavirus-Infektion kann man aufgrund des positiven PCR-Ergebnisses mit Nachweis einer vom Laborstamm (Josiah) abweichenden Mutante sprechen, was eine Kontamination durch die Positivkontrolle, im Rahmen der durchgeführten PCR, ausschließt.

Konsistent mit einer akuten Infektion finden sich der Nachweis von IgM in zwei Elisa-Testen mit Detektionsantikörpern unterschiedlicher Herkunft (Monoklonale Antikörper, polyklonaler Antikörper aus der Maus) sowie im IgM-Immunoblot auf der Basis rekombinant erzeugten Nukleoproteins.

Erstaunlich hoch ist der IgG-Titer in der Immunfluoreszenz, der mit dem fortgeschrittenen Krankheitsbild erklärt werden kann. Auch eine Reinfektion muß grundsätzlich in Betracht gezogen werden, obwohl solche Reinfektionen bisher nur aufgrund von Seroprävalenzstudien vermutet werden können.

Bei der zweiten, durch positiven PCR-Nachweis bestätigten Infektion bei einer 38 Jahre alten Patientin, waren hingegen sämtliche Antikörpernachweise (IgG, IgM) negativ. Trotz der anamnestischen Angabe eines Krankheitsbeginns von ca. 10 Tagen vor der Untersuchung könnte dies für eine Erkrankung im frühen Krankheitsstadium sprechen. Als weitere Möglichkeit käme in Frage, daß die Patientin zu der Gruppe von Lassafieber-Patienten gehört (ca. 12%), die keine nachweisbaren Antikörpertiter entwickeln (Bausch et al., 2000). Als weiterer Hinweis auf eine, möglicherweise auch schwer verlaufende Infektion, fanden sich erhöhte Werte für AST und ALT, wobei allerdings wichtige differentialdiagnostisch in Frage kommende Erkrankungen nicht ausgeschlossen wurden. Das Fehlen einer Leukozytose spricht gegen eine bakterielle Infektion.

Neben Fieber bestand an klinischen Leitsyptomen eine schwere Pharyngitis und Arthralgien, eine Symptomatik die bei vielen „banalen“ Virusinfekten aber auch bei der Lassavirus-Infektion besteht. Anamnestisch bestand darüber hinaus der Hinweis auf eine Blutung aus dem Nasen-Rachenraum oder oberen Gastrointestinaltrakt.

Die Diagnose einer akuten Lassavirus-Infektion wurde klinisch nicht gestellt. Auf Grund des relativ guten Allgemeinzustands zum Zeitpunkt der Untersuchung erfolgte die Behandlung mit Amoxicillin sowie symptomatisch mit Paracetamol. Der weitere Krankheitsverlauf ist nicht bekannt.

Betrachtet man die dritte Patientin (LG30) liegt ein wesenlich leichteres Krankheitsbild als bei dem ersten Patienten vor. Auch hier bewegt sich die Symptomatologie im Rahmen der Klinik, die für Lassavirus-Infektionen beschrieben werden: Kopfschmerzen, Pharyngitis, Konjunktivitis. Die Patientin entfieberte am Tag nach der Aufnahme und verließ das Krankenhaus nach vier Tagen.

Vom ersten beschriebenen Fall unterscheiden sich die immunologischen und virologischen Untersuchungen durch das Fehlen eines positiven PCR-Ergebnisses. Die IgM-Nachweise durch Elisa waren positiv. Die Reaktion im IgM-Immunoblot und IgG/IgM-Immunoblot waren stark positiv. Die Immunfluoreszenz war hochtitrig positiv (1:640). Insgesamt kann man die Befunde mit einer nicht mehr akuten, da PCR-negativen Lassavirus-Erkrankung in Einklang bringen. Über den Zeitraum zwischen akuter Infektion und Aufnahme können jedoch keine Angaben gemacht werden. Legt man die Untersuchungen von Niklasson et al. (1984) zugrunde, in denen IgM in einem Elisa bis zu eineinhalb Jahren nachgewiesen wurde, könnte die Infektion bereits Monate zurückliegen. Die Symptomatik der Patientin wurde klinisch als „grippaler Infekt“ eingestuft.

Auch die vierte Patientin (LG55) weist eine Symptomatik auf, die an eine Lassavirus-Infektion denken läßt. Neben Fieber berichtet die Patientin über trockenen Husten, Schmerzen im Hals, Abdomen und Schultern sowie eine Blutung am rechten Auge vor Aufnahme. Auch die neurologische Symptomatik (Schwindel, Tinnitus) hätte eine Folge einer Lassavirus-Infektion sein können. Sie ist jedoch nach ambulanter Chinintherapie aufgetreten und stellt eine typische Komplikation dieser Behandlung dar. Ebenso waren die körperlichen Untersuchungsbefunde (Konjunktivitis, Pharyngitis, abdomineller Druckschmerz)

mit einer akuten Lassavirus-Infektion vereinbar. Auch hier wurde durch die negative PCR-Untersuchung eine akute Lassavirus-Infektion ausgeschlossen.
Die Immunologischen Parameter bieten ein vergleichbares Bild wie bei der zuvor beschriebenen Patientin (LG30). Eine gleiche virologisch-immunologische Konstellation hatte noch ein weiterer Patient (LG48).
Die im Vergleich mit Sierra Leone deutlich geringeren Fallzahlen für akute Lassafieberinfektionen im Krankengut eines Distriktkrankenhauses in Guinea, wie sie in der vorgelegten Arbeit, aber auch von anderen Untersuchern (Bausch et al., 2000), gefunden wurden, überaschen angesichts hoher Seroprävalenzen im Untersuchungsgebiet, sowie der relativen räumlichen Nähe zu Sierra Leone. Über die Gründe hierfür kann nur spekuliert werden:
Ein wesentlicher Unterschied zwischen Guinea und Sierra Leone zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die deutlichen sozioökonomischen Unterschiede zwischen beiden Ländern auf Grund des Bürgerkriegs in Sierra Leone. Es kann vermutet werden, daß der Ernährungsstatus der Bevölkerung in Sierra Leone deutlich schlechter als in Guinea war.
Hieraus könnten sich zwei Folgen ergeben: Zum einen könnte ein schlechterer Ernährungszustand schwere Verläufe von Lassafieber und damit Krankenhausaufenthalte begünstigen. Zum anderen könnte die vermehrte Jagd auf sogenanntes „Bushmeat“, zu dem auch Mastomys gehört, durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren zu einer gehäuften Infektionsrate führen (ter Meulen et al., 1996).
Eine weitere Möglichkeit wäre das vorkommen virulenterer Lassavirusstämme in Sierra Leone.

E.4.1 Beurteilung der prädiktiven Parameter im klinischen Alltag

Da im Endemiegebiet gerade die hochspezifischen Untersuchungsmethoden des direkten Virusnachweises und der PCR gegenwärtig und wahrscheinlich auch auf längere Sicht nicht in größerem Umfang zur Verfügung stehen werden, bleibt dem vor Ort tätigen medizinischen Personal auch weiterhin nur die Möglichkeit, akute Lassavirus-Infektionen aufgrund differentialdiagnostischer Überlegungen und klinischer Symptome in Erwägung zu ziehen oder auszuschließen.

Aufgrund fehlender pathognomonischer Symptome wurde versucht, Symptomenkomplexe mit höherem Vorhersagewert zu finden (McCormick et al., 1987b). Dies wirft bei der Identifikation von Lassavirus-Infektionen in der Praxis zahlreiche Probleme auf:

Die als prädiktive Parameter bezeichneten Symptome „Pharyngitis und Konjunktivitis“ treten bei sogenannten „grippalen Infekten“ auf und sind in hohem Maße unspezifisch. So hatten während einer sogenannten „Grippeepidemie“ („grippaler Infekt“) ca. 50 % aller Patienten in der Ambulanz des Krankenhauses Gueckedou diese Symptomenkombination.

Der Parameter „retrosternale Schmerzen“ stellt ein subjektives Symptom dar, das sich nicht verifizieren läßt. Aus eigener Erfahrung kann hier gesagt werden, daß sich aufgrund von Sprachproblemen, sowie bei der Interpretation durch Dolmetscher, das Symptom leicht „hineinfragen“ läßt. Auch mag sich der Patient durch „positive“ Beantwortung der Fragen eine bessere Behandlung erhoffen. Weiterhin ist Voraussetzung, daß der Patient trotz seiner Erkrankung noch in der Lage ist, entsprechende Angaben zu machen.

Der Laborparameter „Proteinurie“ läßt sich recht einfach durch Teststreifen erfassen. Bezüglich der Lassavirus-Infektion, die sich auch in der Niere nachweisen läßt (Frame et al., 1970), wäre z.B. eine vermehrte Eiweisausscheidung als Folge der Tubulusschädigung denkbar.

Da die üblichen Teststreifen „Protein“ unspezifisch erfassen, muß eine Kontamination z.B. mit Harnröhrensekret sowie ein Harnwegsinfekt durch die Verwendung von Mittelstrahlurin ausgeschlossen werden. Darüberhinaus können viele Erkrankungen, z.B. auch eine chronische Malaria-Infektion (tropisches Hyperspleniesyndrom), mit einer Proteinurie einhergehen, so daß auch diesem Parameter, insbesondere unter den Bedingungen eines westafrikanischen Distrikthospitals, nur eine sehr geringe „Spezifität“ zukommen dürfte.

Bezüglich der sogenannten prädiktiven Parameter (McCormick et al., 1987b) kann als Fazit aus den eigenen Untersuchungen gesagt werden, daß eine klinische Diagnose einer Lassavirus-Infektion aufgrund der unspezifischen Symptomatik und fehlender pathognonomischer Symptome nicht gestellt werden konnte. Von den untersuchten stationären Patienten hatten ca. 40 % eine Pharyngitis, fast 60 % eine Konjunktivitis und 50 % eine Proteinurie über 100 mg/dl.

Die für hämorrhagische Fieber ansonsten typischen „Hämorrhagien“ scheinen bei Lassafieber nach derzeitigem Kenntnisstand mit ca. 17 % (McCormick et al., 1987b) eher selten und zumeist erst spät im Verlauf der Erkrankung aufzutreten. Auch die Ödeme, Pleura- und Pericardergüsse sowie das interstitielle Lungenödem kennzeichnen das zumeist fortgeschrittene Krankheitsstadium, in dem eine Behandlung mit Ribavirin den Krankheitsverlauf nicht mehr wesentlich positiv beeinflussen kann.

Die Diagnose einer akuten Lassavirus-Infektion aufgrund eines IgM-Nachweises oder einer Serokonversion für IgG erscheint problematisch und führt möglicherweise zu einer erheblichen Überschätzung klinisch manifester Erkrankungen im Krankenhaus. Dies führt dazu, daß die Untersuchungen von Mc Cormick et al. und Johnson et al. zu dem Schluß kommen, daß von den fieberkranken Patienten in Krankenhäusern in Sierra Leone 40 bis 60 % an Lassafieber erkrankt sind (Johnson et al., 1987; McCormick et al., 1987b).
Vor dem Hintergrund einer Vielzahl von tropenspezifischen und nicht tropenspezifischen fieberhaften Erkrankungen, als Beispiel seien nur Malaria oder Pneumonien genannt, scheint ein solcher Anteil an Lassafieber-Patienten unter den Erkrankten zu hoch zu sein.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung auf akute Lassavirus-Erkrankung durch Virusanzucht bzw. PCR identifiziert eine große Anzahl von Lassavirus-Infektionen unter den Patienten mit Fieber im Endemiegebiet.

Durch die PCR besteht eine Methode mit der, in größerem Umfang als bisher, der großen Anzahl inapperent verlaufender Infektionen in der Dorfbevölkerung nachgegangen werden kann.

Die eindeutige Identifikation akuter Lassafieber-Erkrankungen aufgrund des Nachweises von IgM oder mehrfacher Titeranstiege von IgG erscheint, wie oben ausgeführt, vor dem Hintergrund einer großen Zahl von inapparent verlaufenden Infektionen, möglicher Reinfektionen und länger dauernder Persistenz von IgM-Antikörpern problematisch.

Durch die RT-PCR-Untersuchung konnte bei zwei Patienten aus dem Krankenhaus Gueckedou, sowie bei einem Patienten aus einem Flüchtlingslager in Sierra Leone eine akute Lassavirus-Infektion identifiziert werden. Eine klinische Identifizierung akuter Lassavirus-Infektionen gelang auf Grund des Fehlens pathognomonischer Symptome nicht.

Die Methode des Immunoblots für Lassavirus-Infektionen als recht einfach durchzuführende Untersuchungstechnik wurden in dieser Arbeit erstmals erprobt. Eine abschließende Beurteilung des Wertes dieser Untersuchungsmethode, zum Beispiel für epidemiologische Untersuchungen, kann aufgrund der vorliegenden Arbeit noch nicht sicher entschieden werden.

Da es trotz zahlreicher, zumeist inapparent verlaufender, Infektionen immer wieder zu epidemieartigen Ausbrüchen kommt, wären neben bekannten Faktoren wie

zum Beispiel nosokomiale Infektionen durch unzureichend sterilisierte medizinische Hilfsmittel, die hierfür verantwortlichen Faktoren z.B. Auftreten von Virusvarianten oder Migrationsbewegungen von Bevölkerungsgruppen bei künftigen Untersuchungen von besonderem Interesse.

G. LITERATUR

Barber, G.N.; Clegg, J.C.S.; Chamberlain, J.:
Expression of Lassa Virus Nucleocapsid Protein Segments in Bacteria: Purification of High-level Expression Products and their Application in Antibody Detection.
Gene 1987; 56: 137-144.

Barber, G.N.; Clegg, J.C.S.; Lloyd, G.:
Expression of the Lassa Virus Nucleocapsid Protein in Insect Cells Infected with a Recombinant Baculovirus: Application to Diagnostic Assays for Lassa Virus Infection.
J. Gen. Virol. 1990; 71: 19-28.

Bausch, D.G.; Rollin, P.E.; Demby, A.H.; Coulibaly, M.; Kanu, J.; Conteh, A.S.; Wagoner, K.D.; McMullan, L.K.; Bowen, M.D.; Peters, C.J.; Ksiazek, T.G.:
Diagnosis and Clinical Virology of Lassa Fever as Evaluated by Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Indirect Fluorescent-antibody Test, and Virus Isolation.
J. Clin. Microbiol. 2000 Jul.; 38(7): 2670-2677.

Bowen, M.D.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Husted, H.L.; Bausch, D.G.; Demby, A.H.; Bajani, M.D.; Peters, C.J.; Nichol, S.T.:
Genetic Diversity among Lassa Virus Strains.
J. Virol. 2000 Aug.; 74(15): 6992-7004.

Carey, D.E.; Kemp, G.E.; White, H.A.; Pinneo, L.; Addy, R.F.; Fom, A.L.M.D.;
Stroh, G.; Casals, J.; Henderson, B.E.:
Lassa Fever: Epidemiological Aspects of the 1970 Epidemic, Jos, Nigeria.
Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 1972; 66(3), 402-408.

Clegg JCS. Current progress toward vaccines for arena-virus-caused diseases.
Vaccine 1992;10:89-95

Cummins, D.; Bennett, D.; Fisher-Hoch, S.P.; Farrar, B.; McCormick, J.B.:
Electrocardiographic Abnormalities in Patients with Lassa Fever.
J. Trop. Med. Hyg. 1989a; 92: 350-355.

Cummins, D.; Fisher-Hoch, S.P.; Walshe, K.J.; Mackie, I.J.; McCormick, J.B.;
Bennett D.; Perez, G.; Farrar, B.; Machin, S.J.:
A Plasma Inhibitor of Platelet Aggregation in Patients with Lassa Fever.
Brit. J. Haematol. 1989b; 72: 543-548.

Cummins, D.; McCormick, J.B.; Bennet, D.; Samba, J.A.; Farrar, B.; Machin, S.J.;
Fisher-Hoch, S.P.:
Acute Sensorineural Deafness in Lassa Fever.
J. A. M. A. 1990; 264(16): 2093-2096.

Cummins, D.; Bennett, D.; Fisher-Hoch, S.P.; Farrar, B.; Machin, S.J.;

McCormick, J.B.:

Lassa Fever Encephalopathy: Clinical and Laboratory Findings.

J. Trop. Med. Hyg.1992; 95:197-201.

Demby, A.H.; Chamberlain, J.; Brown, D.W.G.; Clegg, C.S.:

Early Diagnosis of Lassa Fever by Reverse Transcription-PCR.

J. Clin. Microbiol. 1994; 32 (12): 2898-2893.

Fields Virologie, Vol.2, 4th Edition Eds. Kniper, D.; Howley, P.

Lippincott, Williams & Wilkins, 2001

Fisher-Hoch, S.P.; Mitchell, S.W.; Sasso, D.R.; Lange, J.V.; Ramsey, R.;

McCormick, J.B.:

Physiological and Immunological Disturbances associated with Shock

in a Primate Model of Lassa Fever.

Infect. Dis. 1987; 155: 465-474.

Fischer-Hoch, S.P.; McCormick, J.B.; Auperin, D; Brown, B.G.; Castor, M.;

Perez, G.; Ruo, S.; Conaty, A.; Brammer, L.; Bauer, S.:

Protection of Rhesus Monkeys from Fatal Lassa Fever by Vaccination with a

Recombinant Vaccinia Virus Containing the Lassa Virus Glycoprotein Gene.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1989; 86: 317-321.

Fisher-Hoch, S.P.; Tomori, O.; Nasidi, A.; Perez-Oronoz, G.I.; Fakile, Y.;

Hutwagner, L.; McCormick, J.B.:

Review of Cases of Nosocomial Lassa Fever in Nigeria: The High Price of Poor Medical Practice.

B. M. J. 1995 Sep.; 311: 857-859.

Fisher-Hoch, S.P.; Hutwagner, L.; Brown, B.; McCormick, J.B.:

Effective Vaccine for Lassa Fever.

J. Virol. 2000 Aug; 74(15): 6777-6783.

Fisher-Hoch, S.P.; McCormick, J.B.:

Towards a Human Lassa Fever Vaccine.

Rev. Med. Virol. 2001 Sep.-Oct.; 11(5): 331-341.

Fleischer, K.; Kohler, B.; Kirchner, A.; Schmitz, J.:

Lassa Fever.

Med. Klin. 2000 Jun.; 95(6): 340-345.

Frame, J.D.; Baldwin, J.M.; Gocke, D.J.; Troup, J.M.:

Lassa Fever, a New Virus Disease of Man from West Africa.

1. Clinical description and Pathological Findings.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 1970; 19: 670-676.

Günther, S.; Emmerich, P.; Laue, T.; Kuhle, O.; Asper, M.; Jung, A.; Grewing, T.; ter Meulen, J.; Schmitz, H.:

Imported Lassa Fever in Germany: Molecular Characterization of a New Lassa Virus Strain.
Emerg. Infect. Dis. 2000 Sep.-Oct.; 6(5): 466-476.

Hedman, K.; Rousseau, S.A.:
Measurement of Avidity of Specific IgG for Verification of Recent Primary Rubella.
J. Med. Virol. 1989; 27: 288-292.

Hjelle, B.; Jenison, S.; Torrez-Martinez, N.; Herring, B.; Quan, S.; Polito, A.; Pichuantes, S.; Yamada, T; Morris, C.; Elgh, F.; Lee, H.W.; Artsob, H.; Dinello, R.:
Rapid and Specific Detection of Sin Nombre Virus Antibodies in Patients with Hantavirus Pulmonary Syndrome by a Strip Immunoblot Assay Suitable for Field Diagnosis.
J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 600-608.

Hufert, F.T.; Lüdke, W.; Schmitz., H.:
Epitope Mapping of Lassa Virus Nucleoprotein Using Monoclonal Anti-nucleocapsid Antibodies.
Arch. Virol. 1989; 106: 201-212.

Hummel, K.B.; Martin, M.L.; Auperin, D.D.:
Baculovirus Expression of the Glycoprotein Gene of Lassa Virus and Characterization of the Recombinant Protein.
Vir . Res. 1992; 25: 79-90.

Jahrling, P.B Protection of Lassa virus-infected Guinea pigs with Lassa-immune plasmaof Guinea pig, primate, and human origin.
J.Med.Virol.12, 93-102

Jahrling, P.B., Niklasson, BS., Mc Cormick JB., Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen et antibody.
Lancet 1985;1:250-252.

Jahrling, P.B.; Peters, C.J. Serology and virulence diversity among Old-World arenaviruses, and the relevance to vaccine developement.
Med Microbiol Immunol 1986; 175:165-167

Jahrling, P.B.; Peters, C.J.:
Arenaviruses. In Lennette, E.H. (Ed.): Laboratory Diagnosis of Viral Infection.
New York: Marcel Dekker 1985; 171-189.

Johnson, K.M; McCormick, J.B., Webb, P.A.; Smith, E.S.; Elliott, L.H.; King, I.J.:
Clinical Virology of Lassa Fever in Hospitalized Patients.
J. Inf. Dis. 1987 Mar.; 155(3): 456-464.

Kangro, H.O.; Manzoor, S.; Harper, D.R.:
Antibody Avidity Following Varicella-Zoster Virus Infections.
J. Med. Virol. 1991; 33: 100-105.

Keenlyside, R.A.; McCormick, J.B.; Webb, P.A.; Smith, E.; Elliott, L.; Johnson, K.M.:
Case-control Study of Mastomys Natalensis and Human in Lassa Virus-infected Households in Sierra Leone.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1983; 32(4): 829-837.

Knobloch, J.; McCormick, J.B.; Webb., P.A.; Dietrich, M.; Schumacher, H.H.; Dennis, E.:
Clinical Observations in 42 Patients with Lassa Fever.
Tropenmed. Parasit. 1980; 31: 389-398.

Lewis, R.M.; Morill, J.C.; Jahrling, P.B.; Cosgiff, T.M.:
Replication of Hemorrhagic Fever Viruses in Monocytic Cells.
Rev. Infect. Dis. 1989; 11: 736-742.

Lukashevich, I.S.; Clegg, J.C.S.; Sidibe, K.:
Lassa Virus Activity in Guinea: Distribution of Human Antiviral Antibody Defined Using Enzyme-linked Immunosorbent Assay with Recombinant Antigen.
J. Med. Virol. 1993; 40: 210-217.

Lunkenheimer, K.; Hufert, F.T.; Schmitz, H.:
Detection of Lassa Virus RNA in Specimens from Patients with Lassa Fever by Using the Polymerase Chain Reaction.
J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2689-2692.

Marriot, A.C.; Polyzoni, T.; Antoniadis, A.; Nuttall, P.A.:
Detection of Human Antibodies to Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Using Expressed Viral Nucleocapsid Protein.
J. Gen. Virol. 1994; 75: 2157-2161.

McCormick, J.B.; King, I.J.; Webb, P.A.; Scribner, C.L.; Craven, R.B.; Johnson, K.M.; Elliott, L.H.; Belmont-Williams, R.:
Lassa Fever: Effective Therapy with Ribavirin.
N. Engl. J. Med. 1986; 314: 20-26.

McCormick, J.B.; Webb, P.A.; Krebs, J.W., Johnson, K.M., Smith, E.S.:
A Prospective Study of the Epidemiology and Ecology of Lassa Fever.
J. Infect. Dis. 1987a; 155: 437-444.

McCormick, J.B.; King, I.J.; Webb, P.A.; Johnson, K.M.; O'Sullivan, R.; Smith, E.S.; Trippel, S.; Tong, T.C.:
A Case-control Study of the Clinical Diagnosis and Course of Lassa Fever.
J. Infect. Dis. 1987b; 155: 445-455.

McCormick, J.B.; Mitchell, S.W.; Kiley, M.P.; Ruo, S.; Fisher-Hoch, S.P.:
Inactivated Lassa Virus Elicits a non Protective Immune Response in Rhesus Monkeys.
J. Med. Virol. 1992; 37: 1-7.

Mohr, W.:

Arena-Virusinfektionen

aus Gsell, O.; Krech, U.; Mohr, W.: Klinische Virologie.

Urban und Schwarzenberg, 1986. ISBN 3-541-12201-3

Monath, T.P.; Mertens, P.E.; Patton, R.; Moser, C.R.; Baum, J.J.; Pinneo, L.;

Gary, G.W.; Kissling, R.E.:

A Hospital Epidemie of Lassa Fever in Zorzor, Liberia, March - April 1972.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 1973; 22: 773-779.

Monath, T.P.; Maher, M.; Casals, J.; Kissling, R.E.; Cacciapuoti, A.:

Lassa Fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972;

II. Clinical Observations and Virological Studies on Selected Hospital Cases.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 1974; 23(6): 1140-1148.

Monath, T.P.:

Lassa Fever - New Issues Raised by Field Studies in West Africa.

J. Inf. Dis. 1987 Mar.; 155(3): 433-444.

Monson, M.H.; Cole, A.K.; Frame, J.D.; Serwint, J.R.; Alexander, S.; Jahrling, P.B.:

Pediatric Lassa Fever: A Review of Liberian Cases.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 16(2): 408-415.

Morrison, H.G.; Bauer, S.P.; Lange, J.V.; Esposito, J.J.; McCormick, J.B.; Auperin, D.D.:
Protection of Guinea Pigs from Lassa Fever by Vaccinia Virus Recombinants Expressing the Nucleoprotein or the Envelope Glycoproteins of Lassa Virus.
Virol. 1989; 171: 179-188.

Niklasson, B.S.; Jahrling, P.B.; Peters C.J.:
Detection of Lassa Virus Antigens and Lassa Virus-specific Immuno-globulins G and M by Enzyme-linked Immunosorbent Assay.
J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 239-244.

Price, M.E.; Fisher-Hoch, S.P.; Craven, R.B.; McCormick, J.B.:
A Prospective Study of Maternal and Fetal Outcome in Akute Lassa Fever Infection During Pregnancy.
B. M. J. 1988, 297: 584-586.

QIAGEN 1992. The QIA expressionist. Hilden, Germany.

Robert-Koch-Institut:
Fallberichte: Importiertes Lassa-Fieber in London und Wiesbaden.
Epidemiol. Bull. 2000 Apr.; 14: 112-113.

Rosevear, D.R.; The Rodents of West Afrika
Trustees of The British Mueeum (Natural History) London: 1969

Ruo, S.L.; Mitchell, S.W.; Kiley, M.P.; Roumillat, L.F.; Fischer-Hoch, S.P.; McCormick, J. B.:
Antigenic Relatedness between Arenaviruses Defined at the Epitope Level by Monoclonal Antibodies.
J. Gen. Virol. 1991; 72: 549-555.

Schmitz H.; Wolf, H.R.:
Use of Monoclonal Antibody for the Detection of Lassa Virus Antibody and Antigen in Patients with Lassa Fever.
Med. Microbiol. Immunol. 1986; 175: 181-182.

Schmitz, H.; Emmerich, P.; ter Meulen, J.:
Imported Tropical Virus Infections in Germany.
Arch. Virol. 1996; 11(Suppl.): 67-74.

Solbrig, M.V., McCormick, J. B.:
Lassa Fever: Central Nervous System Manifestations.
J. Trop. Geog. Neurolog. 1991; 1: 23-30.

Ter Meulen, J.; Lukashevich, L.; Sidibe, K;. Inapogui, A.; Marx, M.; Dörlemann, A.; Yansane, M. L.; Koulemou, K.; Chang-Claude, J.; Schmitz, H.:
Hunting of Peridomestic Rodents and Consumption of their Meat as Possible Risk Factors for Rodent-to-human Transmission of Lassa Virus in the Republic of Guinea.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 1996; 55: 661-666.

Ter Meulen, J.; Koulemou, K.; Wittekindt, T.; Windisch, K.; Strigl, S.; Conde, S.; Schmitz, H.:
Detection of Lassa Virus Antinucleoprotein Immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies by a Simple Recombinant Immunoblot Assay for Field Use.
J. Clin. Microbiol. 1998 Nov.; 36(11): 3143-3148.

Ter Meulen, J.:
Lassa Fever Implications of T-cell Immunity for Vaccine Development.
J. Biotechnol. 1999 Aug.; 73(2-3): 207-212.

Ter Meulen, J.; Badusche, M.; Kuhn, K.; Doetze, A.; Satoguina, J.; Marti, T.; Loeliger, C.; Koulemou, K.; Koivogui, L.; Schmitz, H.; Fleischer, B.; Hoerauf, A.:
Characterization of Human CD4(+)T-cell Clones Recognizing Conserved and Variable Epitopes of the Lassa Virus Nucleoprotein.
J. Virol. 2000 Mar.; 74(5): 2186-2192.

Trappier, S.G.; Conaty, A.L.; Farrar, B.B.; Auperin, D.D.; McCormick, J.B.; Fisher-Hoch, S.P.:
Evaluation of the Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Lassa Virus Infection.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1993; 49(2): 214-221.

Troup, J.M.; White, W.A.; Fom, A.L.M.D.; Carey, D.E.:

An Outbreak of Lassa Fever on the Jos Plateau, Nigeria, in January - February 1970: a Preliminary Report.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 1970; 19: 695-696.

Walker, D.H.; McCormick, J.B.; Johnson, K.M.; Webb, P.A.; Komba-Kono, G.; Elliott, L.H.; Gardner, J.J.:

Pathologic and Virologic Study of Fatal Lassa Fever in Man.

Am. J. Pathol. 1982, 107: 349-356.

Ward, K.N.; Gray, J.J.; Joslin, M.E.; Sheldon, M.J.:

Avidity of IgG Antibodies to Human Herpesvirus-6 Distinguishes Primary from Recurrent Infection in Organ Transplant Recipients and Excludes Cross-Reactivity with Other Herpesviruses.

J. Med. Virol. 1993; 39: 44-49.

Webb, P.A.; McCormick, J.B.; King, I.J.; Bosman, I.; Johnson, K.M.; Elliott, L.H.; Komba-Kono, G.; O´Sullivan, R.:

Lassa Fever in Children in Sierra Leone, West Africa.

Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 1986; 80: 577-582.

White, H.A.:

Lassa Fever: A Study of 23 Hospital Cases.

Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 1972; 66(3): 390-401.

Winn, W.C.; Monath, T.P.; Murphy, F.A., Whitfield, S.G.:

Lassa Virus Hepatitis: Observations on a Fatal Case from the 1972

Sierra Leone Epidemic.

Arch. Pathol. 1975; 99: 599-604.

World Health Organization:

Lassa Fever in Sierra Leone.

Weekly Epidem. Rec. 1997; 72: 157-164.

Wulff, H.; Johnson, K.M.:

Immunglobulin M and G Responses Measured by Immunfluorescence in

Patients with Lassa or Marburg Virus Infections.

Bull. WHO 1979; 57(4): 631-635.

H. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALT	Alanin-amino-transferase
AST	Aspertat-amino-transferase
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
BSA	Bovines Serum Albumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
GP	Glykoprotein
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IU/l	international units pro liter
kb	kilo-Basen
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LCM	Lymphozythäre Chorio Meningitis
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
M	Molarität
mM	millimolar

MHC	Major Histokompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
MAb	Monoklonale Antikörper
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotide
PBS	Phosphat Buffered Saline
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Chain-Reaktion
pH	pH-Wert
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
$TCID_{50}$/ml	Gewebekultur-Infektionsdosis in 1 ml, die 50 % der Zellen einer Gewebekultur infizieren
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Tris-HCl	Tris-puffer mit Salzsäure eingestelltem pH
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Anlage

Fragebogen

ETUDE DE LA FIEVRE LASSA, HOSPITAL GUECKEDOU, GUINEE

Date: Nom: Lit.:

Sex: Age: Ethnie:

Résidence permanente:

A) COMMENCEMENT DE LA MALADIE

Date de première plainte:

Commencement de la maladie: brusque lentement

Les première plaintes:

Date de la debut de la fièvre:

Commencement de la fièvre: brusque lentement

B) PLAINTES ACTUELLES

Maux de tete:	oui	non	Mal de gorge:	oui	non
Toux sèche: oui	non		Vertige:	oui	non
Mal au Ventre:	oui	non	Vomissement:	oui	non
Diarrhèe:	oui	non	Dysurie:	oui	non
Notalgie:	oui	non	Douleur derriere le sternum:	oui	non
Arthralgie:	oui	non	Jointures douloureuseses:	épaule	
			coude poignet hanche genou		
			malléole		

Autre plaintes:

C) SYMPTOMES ACTUELLES

Fièvre °C Tens.art.: mm Hg Poulse: / min

Frequ. resp.: / min Rales: oui non

Oedéme faciale: oui non Conjonctivite: oui non

Pharyngite: oui non Doleur abdom.à la pression: oui non

Hémorrhagie: oui non

Localisation: Conjonctivale nasale gingivale gastroenterale vaginale

Autre symptomes:

D) SYMPTOMES NEUROLOGIQUES

Commencement des symptomes: Au debut de la maladie a la fin

Méningisme: oui non Babinski positive: oui non

Convulsion: oui non Ataxie: oui non

Nystagmus: oui non Reflexes: absentes faibles normales

Paresthesie: oui non Local.:

Paralysie: oui non Local.:

Dystonie: oui non Local.:

Tremblement: oui non État spasmodique:

Obnubilation: oui non Trouble du sommeil: oui non

Amnesie: oui non Changement de la personalité: oui non

Autres symptomes:

DIAGNOSE: Encéphalite virale Encéphalopathie métabolique

E) FACTEURS DE RISQUE

Pendant les derniers deux semaines, est-ce que le malade a

- tué des rats ? oui non Date:
- preparé des rats pour manger ? oui non Date:
- mangé des rats ? oui non Date:
- eu de contact avec les selles ou les urines des rats ?

- eu de contact avec un autre malade fébrile ?

Si qui, est-ce que le contact a eté:

Soin journalier contact familial contact sexuell ?

F) RESULTATS DE LABORATOIRE

Course de fièvre et d`hemorrhagie (indique: „H“)

42																
41																
40																
39																
38																
37°C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	14	15

jours

Hématologie (résultat/date)

Hb: _____ _____ _____ _____ _____

Hk: _____ _____ _____ _____ _____

Leukocytes: _____ _____ _____ _____ _____

Segmentes: _____ _____ _____ _____ _____

Lymphozythes: _____ _____ _____ _____ _____

Basophiles: _____ _____ _____ _____ _____

Eosinophiles: _____ _____ _____ _____ _____

Autres: _____ _____ _____ _____ _____

Examination d `urine et de selle (résultat/date)

Leukocytes:	_____	_____	_____	_____	_____
Nitrit:	_____	_____	_____	_____	_____
Protein:	_____	_____	_____	_____	_____
Glucose:	_____	_____	_____	_____	_____
Keton:	_____	_____	_____	_____	_____
Urobilirubin:	_____	_____	_____	_____	_____
Bilirubin:	_____	_____	_____	_____	_____
Sangues:	_____	_____	_____	_____	_____

Resutats des autres examinations

Malaria:

Examination bactériologique:

Examination parasitologique:

Abaissement de la fièvre par la thérapie avec:

Chloroquine: oui non Antibiotiques: oui non

Rec. Prot.: Jos 6/8

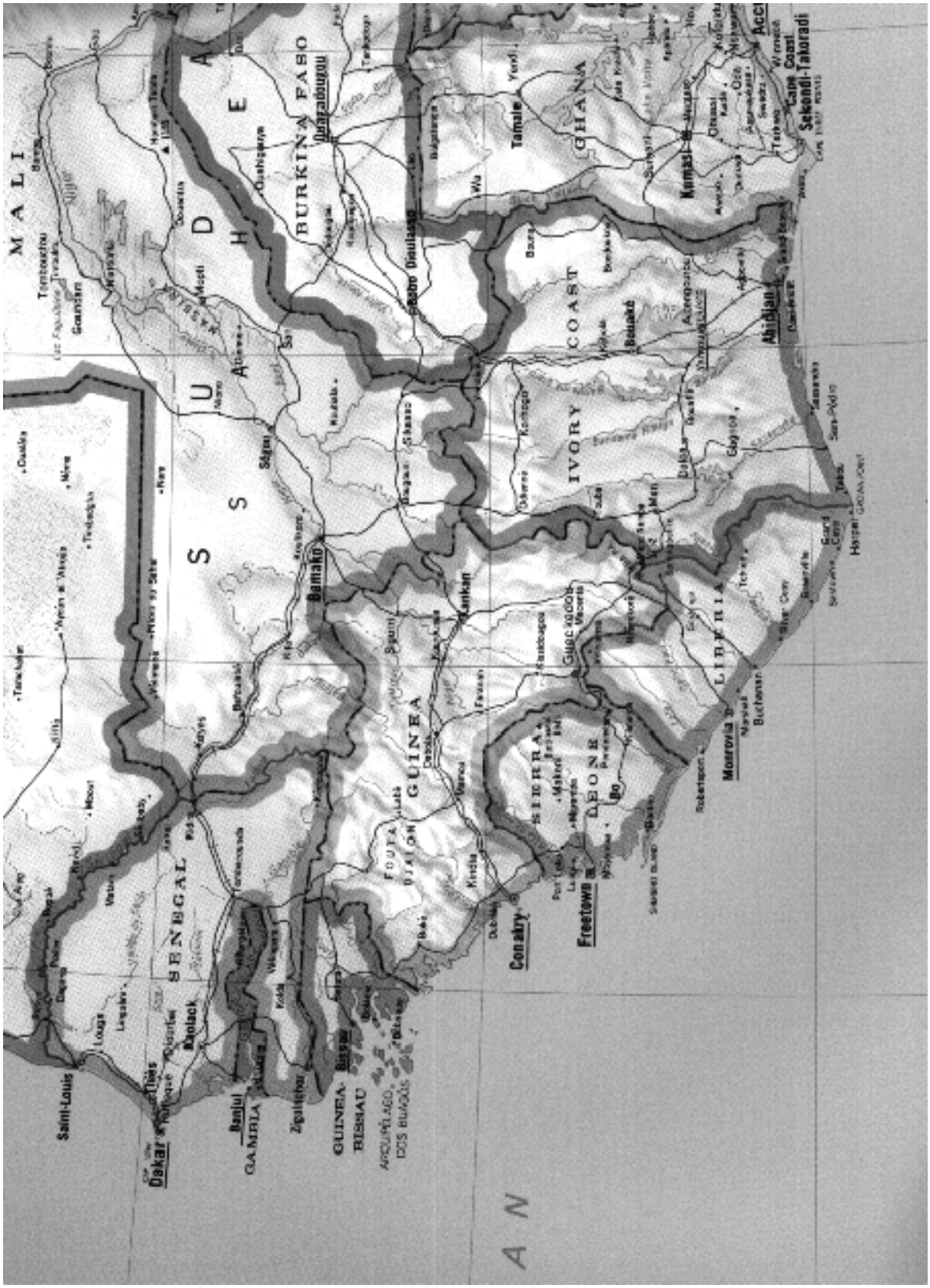
DATE: 6.11.92

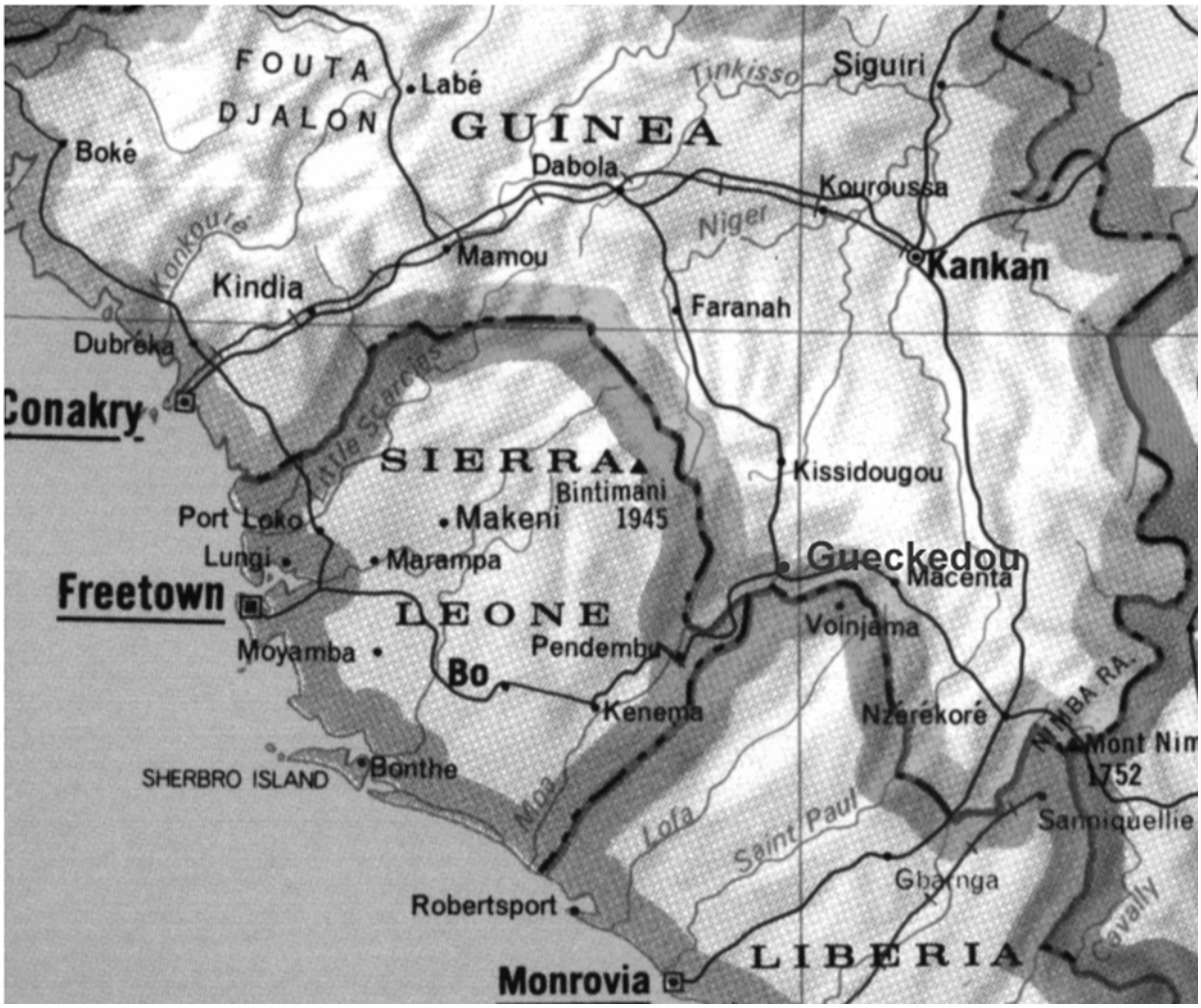
	SERUM	5ug	1mg ~~100ng~~	~~10ng~~		LYS 5mg
1	B2 / PBS Kontrolle	+	+		+	–
2	Schafst	((+))	((+))		–	((+))
3	8/12/24A	((+))	–		–	–
4	12/2/19A	–	–		–	–
5	10/3/35	–	–		–	–
6	15/4/23	+	(+)		+	(+)
7	24/1/3	–	–		–	–
8	6/7/25	(+)	((+))		+/–	((+))
9	2/3/19	(+)	((+))		(+)	((+))
10	1/2/18	(+)	((+))		(+)	((+))
11	26/3/38	+	+		+	–
12	4/3/16	(+)	((+))		(+)	((+))
13	24/3/25	–	–		–	–
14	12/2/21A	(+)	((+))		(+)	((+))
15	12/2/21B	(+)	((+))		+/–	((+))
16	3/1/7	((+))	((+))		–	((+))
17	3/1/25A	((+))			–	((+))
18	3/1/25B	((+))	–		–	((+))
19	8/1/34	((+))	–		–	((+))
20	8/1/3B	–	–		–	–

Dilution de Serum: 1:50 Incubation: 1+5h Lavage: 3x10 Min

Dilution de Conjugé: 1:2000 Incubation: 1h Lavage: 3x10 Min

A = Abzyme


MALI
BURKINA FASO
Ouagadougou
Bobo Dioulasso
GHANA
Tamale
Kumasi
Cape Coast
Sekondi-Takoradi
IVORY COAST
Abidjan
Bouaké
Bamako
Kankan
GUINEA
SIERRA LEONE
Freetown
Conakry
LIBERIA
Monrovia
SENEGAL
Saint-Louis
Dakar
Thiès
Kaolack
Banjul
GAMBIA
Zigaluchar
Bissau
GUINEA-BISSAU
ARCHIPÉLAGO DOS BIJAGÓS
FOUTA DJALON


FOUTA
DJALON
Labé
GUINEA
Tinkisso
Siguiri
Boké
Dabola
Kouroussa
Niger
Kankan
Mamou
Kindia
Faranah
Dubréka
Conakry
SIERRA
Bintimani
1945
Kissidougou
Port Loko
Makeni
Lungi
Marampa
Gueckedou
Macenta
Freetown
LEONE
Voinjama
Moyamba
Pendembu
Bo
Kenema
Nzérékoré
NIMBA RA.
Mont Nim
1752
SHERBRO ISLAND
Bonthe
Moa
Lofa
Saint Paul
Sanniquellie
Gbarnga
Robertsport
Cavally
LIBERIA
Monrovia

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. H. Schmitz und seinen Mitarbeitern danke ich sehr für die Möglichkeit, die erforderlichen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit in der Virologischen Abteilung des BNI durchführen zu können und daß sie mir dabei mit Rat und Tat zur Seite standen.
Herr Dr. J. ter Meulen half mir außerdem durch die guten Beziehungen zum Krankenhaus Gueckedou und durch seine ausdauernde Bereitschaft, in zahlreichen Diskussionen, Antworten auf Fragen in der Interpretation meiner Ergebnisse zu finden.
Stellvertretend für die zahlreichen Mitarbeiter, die mir im Krankenhaus Gueckedou durch ihre unentbehrliche Unterstützung geholfen haben, möchte ich Dr. Ablo Diallo und Dr. Kekoura Koulemou erwähnen.
Letzlich wäre diese Arbeit ohne die Unterstützung durch meine Familie nicht möglich gewesen.