

# **Entwicklung und Validierung eines IgM-Immunkomplex-ELISA Systems**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften des  
Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Anne Rackow**

Hamburg, 2017

Disputation am 08.12.2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Herbert Schmitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thorsten Burmester

## Zusammenfassung

Tropische Infektionskrankheiten sind nicht mehr nur auf die Tropen beschränkt. Durch die zunehmende Globalisierung werden Viren über die Kontinentalgrenzen hinweg getragen und neue serologische Testsysteme zur Erkennung von Virusinfektionen werden dringend benötigt. Durch die Epidemie des bis dato weitestgehend nur Spezialisten bekannten Zika Virus 2015 in Lateinamerika und den Ebola-Virus-Ausbruch 2014 in mehreren Ländern Westafrikas ist die Thematik aktueller denn je.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuartige Technologie zum Nachweis von IgM-Antikörpern im humanem Serum entwickelt und zum Patent angemeldet. Der IgM-ELISA beruht auf dem Immunkomplex (IC)-ELISA-Prinzip, hierbei werden Immunkomplexe, bestehend aus rekombinantem Virusantigen und pathogen-spezifischen Antikörpern durch die Immunglobulin-ähnliche Domäne (Ig-Domäne) von Fc-Rezeptoren gebunden.

Im Verlauf dieser Promotionsarbeit wurde die Ig-Domäne des IgM-bindenden Fc $\mu$ -Rezeptors (TOSO, FAIM3) kloniert, im prokaryotischen Expressionssystem exprimiert und in größeren Mengen (mg) reproduzierbar gereinigt. Im Zuge der Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Ig-Domäne des Fc $\mu$ R stellte sich die besondere Eignung als Capture-Molekül für den IgM-IC-ELISA durch die Bindung von IgM-Ak in Immunkomplexform heraus. Die parallel dazu verlaufende Reinigung von flaviviralen und bunyaviralen rekombinanten Antigenen machte es möglich, den neuartigen IgM-IC-ELISA zu etablieren.

Unter Einhaltung der international vorgegebenen Richtlinien zur Herstellung von in vitro-Diagnostika (ISO 13485) wurden IgM-IC-ELISA zur Detektion von akuten Flavivirus (West-Nil-Virus, Zika-Virus (ZIKV))-Infektionen und Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV)-Infektionen entwickelt. Bei der Etablierung der flaviviralen IgM-IC-ELISA erwies sich das rekombinante Nicht-Strukturprotein 1 gegenüber den rekombinanten E- und ED3-Proteinen als das am besten geeignete Antigen. Das in dieser Studie entwickelte ZIKV-IgM-IC-ELISA Testsystem wurde in Brasilien mit Patientenproben des Virusausbruches von 2015 getestet und die Fähigkeit eines funktionierenden ELISA Testsystems (Sensitivität 100 %, Spezifität 99 %) nachgewiesen. Die Validierung des CCHFV-IgM-IC-ELISA mit aktuellen Serumproben aus dem Kosovo zeigte sowohl eine hohe Sensitivität (100 %) und Spezifität (98 %) als auch eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des IgM-IC-ELISA.

Bei dem Vergleich mit kommerziellen Diagnostika konnten im Besonderen bei der ZIKV-Diagnostik verbesserte Ergebnisse erzielt werden. Bei der Analyse der brasilianischen Patientenproben wurde mit dem ZIKV-IgM-IC-ELISA eine höhere Sensitivität innerhalb der Vergleichsstudie nachgewiesen.

Die Bindung der IgM-Immunkomplexe durch die Ig-Domäne des Fc $\mu$ R konnte zusätzlich zum ELISA-Format zu einem ersten qualitativen Schnelltest zur Detektion von Virusinfektionen weiterentwickelt werden.

## Summary

Tropical infectious diseases are no longer only limited to the tropical regions. Due to increasing globalization, viruses are carried beyond continental borders and therefore novel serological test systems for the detection of virus infections are urgently needed. The topic is more relevant than ever due to the recent Zika-Virus epidemic in Latin America, which was caused by a virus only known to specialists before this incident, and due to the Ebola Virus outbreak in West Africa in 2014.

Here, a novel technology for the detection of IgM antibodies in human sera was developed and registered for patent. The IgM-ELISA is based on the immune complex (IC)-ELISA principle, where immune complexes, consisting of recombinant virus antigens and pathogen-specific antibodies, are bound to the immunoglobulin-like domain (Ig-domain) of Ig subtype specific Fc-receptors.

To do this, the Ig-domain of the IgM-binding Fc $\mu$ -Receptor (TOSO/FAIM3) was cloned, expressed in a prokaryotic expression system and purified in reproducible amounts (mg). The Ig-domain specifically binds to IgM/antigen immune complexes and thus is suitable as a capture-molecule for the IgM-IC-ELISA. The purification of the flaviviral and bunyaviral antigens was done in parallel in order to establish the novel IgM-IC-ELISA.

The IgM-IC-ELISA for the detection of acute flaviviral (Zika-Virus (ZIKV), West-Nile-Virus WNV) and Crimean-Congo-Hemorrhagic-Fever-Virus (CCHFV) infections were developed according to international regulations for the production of in vitro-diagnostics (ISO 13485). During the setup of the flaviviral IgM-IC-ELISA it was demonstrated that the non-structural protein 1 is more suitable as an antigen than the recombinant E- and ED3- protein. The analysis of the patient samples collected during the virus outbreak in Brazil in 2015 proved the functionality of the developed ZIKV-IgM-IC-ELISA test system (sensitivity 100 %, specificity 99 %). The validation of the CCHFV-IgM-IC-ELISA with acutely ill CCHF patients from Kosovo shows a high sensitivity (100 %) and specificity (98 %) as well as a high precision and reproducibility of the IgM-IC-ELISA.

In comparison with commercially available ELISA tests, better results could be achieved with the ZIKV-IgM-IC-ELISA. A higher sensitivity was reached with the ZIKV-IgM-IC-ELISA during the analysis of the patient samples from Brazil.

Additionally, due to the exclusive binding of the IgM immune complexes to the Ig-domain of the Fc $\mu$ R, further experiments showed a potential for the development of a rapid test for the detection of virus infections.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>II</b>
<b>Summary</b> .....	<b>IV</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1 Arboviren .....	13
1.1.1 Ausbreitung von Arboviren .....	13
1.1.2 Flavivirus .....	15
1.1.2.1 West-Nil-Virus (WNV).....	18
1.1.2.2 Zika-Virus (ZIKV).....	18
1.1.3 Nairovirus .....	19
1.1.3.1 Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV) .....	20
1.1.4 Diagnostik von Arbovirus-Infektionen.....	21
1.1.5 Testentwicklung von In-vitro Diagnostika (IVD).....	23
1.2 Fc-Rezeptoren.....	25
1.2.1 FcγRIIa: Fc-Rezeptor für IgG .....	28
1.2.2 FcμR: Fc-Rezeptor für IgM.....	28
1.2.3 Verwendung von Fc-Rezeptoren als Capture-Moleküle in ELISA-Systemen.....	30
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	33
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.1 Material.....	34
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	34
2.1.2 Puffer und Medien .....	35
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	38
2.1.4 Geräte .....	39
2.1.5 Kits .....	40
2.1.6 Marker .....	41
2.1.7 Bakterienzellen.....	41
2.1.8 Plasmide und Vektoren .....	42
2.1.9 Antikörper .....	43
2.1.10 Enzyme .....	43
2.1.11 Oligonukleotide.....	44
2.1.12 Programme und Datenbanken .....	44
2.1.13 Seren.....	45
2.2 Methoden .....	46
2.2.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden .....	46
2.2.1.1 cDNA-Synthese.....	46
2.2.1.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	46

2.2.1.3 Restriktionsverdau.....	47
2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	47
2.2.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Aufreinigung.....	48
2.2.1.6 Photometrische Konzentrations-und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	48
2.2.1.7 Klonierung .....	48
2.2.1.8 Herstellung chemokompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	49
2.2.1.9 Transformation von DNA in chemokompetente <i>E.coli</i> Zellen.....	50
2.2.1.10 Plasmidpräparation .....	50
2.2.1.11 DNA-Sequenzierung .....	50
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	51
2.2.2.1 Expression rekombinanter Proteine .....	51
2.2.2.2 Herstellung von Dauerkulturen.....	52
2.2.2.3 Zellaufschluss von <i>E.coli</i> .....	52
2.2.2.4 Solubilisierung der Einschlusskörper .....	52
2.2.2.5 Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen ..	53
2.2.2.6 Bradford-Test .....	53
2.2.2.7 Reduzierung und Rückfaltung .....	54
2.2.2.8 Konzentrierung des Rückfaltungsansatzes.....	54
2.2.2.9 Umpufferung mittels <i>Zeba Spin Desalting Columns</i> .....	55
2.2.2.10 Polyhistidin <sub>10</sub> -Tag Abspaltung mit der 3C-Protease .....	55
2.2.2.11 Gelfiltration .....	55
2.2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Coomassie Blaufärbung .....	56
2.2.2.13 HRP-Markierung der rekombinanten Antigene .....	56
2.2.3 Immunologische Nachweisverfahren .....	57
2.2.3.1 Anti ZIKV Virus ELISA (IgM/IgG), Euroimmun AG .....	57
2.2.3.2 VectoCrimea-CHF-IgG/IgM, Vector Best .....	58
2.2.3.3 West Nile Virus IgM Capture DxSelect™, Focus Diagnostics.....	59
2.2.3.4 Schachbrett-ELISA (indirekter ELISA) .....	59
2.2.3.5 µ-Capture ELISA .....	60
2.2.3.6 IgG-Immunkomplex ELISA.....	61
2.2.3.7 IgM-Immunkomplex ELISA.....	61
2.2.3.8 Schnelltest basierend auf Aggregation von Latexpartikeln .....	64
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
3.1 Herstellung eines neuen Capture-Moleküls für die Entwicklung des IgM-Immunkomplex-ELISA .....	65
3.1.1 Klonierung .....	65
3.1.2 Expression und Reinigung .....	66
3.2 Bindungseigenschaften der Immunglobulin-ähnlichen Domäne des Fcµ- Rezeptors .....	68
3.2.1 Beschichtung von ELISA-Streifen mit His-FcµR-Ig .....	68
3.2.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften vom His-FcµR-Ig.....	70
3.2.2.1 Spezifische Bindung von IgM-Antikörpern in Form von IgM/Antigen-Immunkomplexen .....	70

3.2.2.2 Keine unspezifische Bindung von IgG/Antigen-Immunkomplexen in humanen und tierischen Serumproben.....	72
3.3 IgM-Immunkomplex ELISA.....	74
3.3.1 IgM-IC ELISA zur Detektion von akuten Flavivirus-Infektionen.....	74
3.3.1.1 Herstellung HRP-markierter WNV-ED3/HRP und WNV-EP/HRP Antigene.....	74
3.3.1.2 IgM-IC-ELISA unter Verwendung der rekombinanten WNV-ED3/HRP und WNV-EP/HRP Antigene .....	77
3.3.1.3 Herstellung des HRP-markierten ZIKV-NS1 Antigens .....	79
3.3.1.4 Inter- und Intra-Assay Variation.....	81
3.3.1.5 Sensitivität und Spezifität .....	82
3.3.1.6 Analyse der Zika-Virus infizierten Patienten aus Brasilien .....	85
3.3.1.7 Vergleich des ZIKV-IgM-IC-ELISA mit dem anti-Zika-Virus IgM-ELISA von Euroimmun .....	86
3.3.2 IgM-IC-ELISA zur Detektion von akuten CCHFV-Infektionen .....	88
3.3.2.1 Inter- und Intra-Assay Variation.....	88
3.3.2.2 Einfluss von Störfaktoren auf den IC-ELISA .....	89
3.3.2.3 Sensitivität und Spezifität .....	90
3.3.2.4 Analyse CCHFV infizierter Serumproben (humanen und tierischen Ursprungs).....	93
3.3.2.5 Vergleich des CCHFV-IgM-IC-ELISA mit einem <i>in-house</i> $\mu$ -Capture-ELISA .....	96
3.4 Weiterentwicklung zum Schnelltest: IgM/Antigen-Immunkomplexbindung durch His-Fc $\mu$ R-Ig .....	97
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>99</b>
4.1 Fc $\mu$ R: Herstellung und Potential als Capture-Molekül.....	99
4.2 Evaluierung des IgM-IC-ELISA .....	101
4.3 Weiterentwicklung zum Schnelltest: <i>proof-of-principle</i> .....	112
<b>Anhang .....</b>	<b>114</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>129</b>
<b>Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen.....</b>	<b>130</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>131</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ae	<i>Aedes</i>
Ak	Antikörper
AmpR	Ampicillin-Resistenz
Anz.	Anzahl
BNITM	Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin
bp	Basenpaare
BP	Blockierungspuffer
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Celsius
CCHFV	Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus
CDB	<i>conjugate dilution</i> buffer (Konjugatverdünnungslösung)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DENV	Dengue-Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreithol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED1	Hüllprotein (E-Protein) Domäne 1
ED2	Hüllprotein (E-Protein) Domäne 2
ED3	Hüllprotein (E-Protein) Domäne 3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E-Protein/ EP	<i>envelope</i> Protein (Hüllprotein)
et al.	<i>et alteri</i> (unter anderem)
FAIM3	Fas-apoptotische inhibierende Molekül 3
FcR	Fc-Rezeptoren
FcγR	Fcγ-Rezeptor (Fc-Rezeptor für die Bindung von IgG-Antikörpern)
FcμR	Fcμ-Rezeptor (Fc-Rezeptor für die Bindung von IgM-Antikörpern)
FUO	<i>Fever of unknown Origin</i> (Fieber unbekannter Herkunft)
g	Erdbeschleunigung/ Gramm
gB	gesunde Blutspender
His <sub>10</sub>	zehn Histidinreste am N-oder C-Terminus eines Proteins
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IC	Immunkomplex (bestehend aus Antigen und Antikörper)
IFT	Immunfluoreszenz Technik
Ig	Immunglobulin-ähnliche Domäne
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
JEV	Japanisches-Enzephalitis-Virus

Kana	Kanamycin
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	monoklonal
M	molar
MeV	<i>Measles virus</i> (Masernvirus)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> (Murines Leukämievirus)
M-Protein	<i>membrane</i> -Protein
n/a	nicht verfügbar/ nicht vorhanden
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NMWL	<i>Nominal Molecular Weight Limit</i>
NS1	Nicht-Strukturprotein 1
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pIgR	Poly-Ig-Rezeptor
prM-Protein	<i>precursor membrane</i> Protein (Vorläufer des M-Protein)
PRNT	<i>Plaque reduction neutralization test</i>
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (statistisches Verfahren)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RUBV	<i>Rubella virus</i> (Rötelnvirus)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDB	Serumverdünnungslösung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SLEV	St.-Louis-Enzephalitis-Virus
Tab.	Tabelle
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i> (Frühsommer-Meningoenzephalitis)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
WNV	West-Nil-Virus
üN	über Nacht
YFV	<i>Yellow-fever-virus</i> (Gelbfiebertvirus)
ZIKV	Zika-Virus

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Reaktionsansatz für PCR. ....	46
<b>Tabelle 2:</b> PCR-Programm. ....	47
<b>Tabelle 3:</b> Reaktionsansatz für Restriktionsverdau. ....	47
<b>Tabelle 4:</b> Reaktionsansatz für das <i>A-tailing</i> der DNA-Sequenz. ....	49
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht Rückfaltungsbedingungen. ....	54
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht Gelfiltrationspuffer der rekombinanten Proteine. ....	56
<b>Tabelle 7:</b> HRP-Markierungsbedingungen. ....	56
<b>Tabelle 8:</b> Detaillierte Übersicht der IgM-IC-ELISA. ....	63
<b>Tabelle 9:</b> Ergebnisübersicht des West Nile Virus IgM Capture DXSelect™. ....	79
<b>Tabelle 10:</b> Vergleich der Serumpanelergebnisse (179) von IgM-IC-ELISA und $\mu$ - Capture-ELISA. ....	97

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Weltweite Ausbreitung der in dieser Arbeit relevanten Arboviren. ....	14
<b>Abbildung 2:</b> Struktur und Genom des Flavivirus. ....	17
<b>Abbildung 3:</b> Struktur und Genom des Nairovirus. ....	20
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufes nach einer Virusinfektion. ....	23
<b>Abbildung 5:</b> Tabellarische Übersicht der aktuellen kommerziellen ELISA zur Detektion von CCHFV-, WNV- und ZIKV-Infektionen. ....	25
<b>Abbildung 6:</b> Funktionen der Fc-Rezeptoren. ....	27
<b>Abbildung 7:</b> Struktur des FcγRIIa. ....	28
<b>Abbildung 8:</b> Putative Struktur des FcμR. ....	30
<b>Abbildung 9:</b> Prinzip des Immunkomplex-ELISA. (A) IgG-IC-ELISA. (B) IgM-IC-ELISA. ....	31
<b>Abbildung 10:</b> Prinzip der etablierten ELISA-Methoden: indirekter ELISA (A) und μ-Capture-ELISA (B). ....	32
<b>Abbildung 11:</b> Fließdiagramm über die Abfolge der verwendeten proteinbiochemischen Methoden. ....	51
<b>Abbildung 12:</b> Schematische Darstellung der Anti ZIKV Virus ELISA (IgM/IgG). ....	57
<b>Abbildung 13:</b> Schematische Darstellung des VectoCrimea-CHF-IgG (indirekter-ELISA) und VectoCrimea-CHFV-IgM (μ-Capture-ELISA). ....	58
<b>Abbildung 14:</b> Schematische Darstellung des West Nile Virus IgM Capture DxSelect™. ....	59
<b>Abbildung 15:</b> Struktur des IgM Fc-Rezeptors mit der schematischen Darstellung des <i>pJC45-His<sub>10</sub>-Xa-3C-FcμR-Ig</i> . ....	65
<b>Abbildung 16:</b> Reinigung und Expression His-FcμR-Ig. ....	67
<b>Abbildung 17:</b> Beschichtung ELISA-Streifen mit His-FcμR-Ig. ....	69
<b>Abbildung 18:</b> Schematische Darstellung der ELISA. ....	71
<b>Abbildung 19:</b> His-FcμR-Ig bindet IgM-Antikörper nur in Immunkomplexform. ....	72
<b>Abbildung 20:</b> Die Immunglobulin-ähnliche Rezeptordomäne des FcμR bindet spezifisch IgM/ Antigen-Immunkomplexe humanen und tierischen Ursprungs und keine IgG/Antigen-Immunkomplexe. ....	73
<b>Abbildung 21:</b> WNV-ED3 und WNV-EP. ....	76
<b>Abbildung 22:</b> Ergebnis nach Untersuchung eines Serumpanels mit 96 Seren im WNV IgM-IC-ELISA und μ-Capture-ELISA. ....	78
<b>Abbildung 23:</b> ZIKV-NS1: Klonierung, Expression und Reinigung. ....	80
<b>Abbildung 24:</b> Intra- und Inter-Assay Variation des ZIKV-IgM-IC-ELISA. ....	82
<b>Abbildung 25:</b> Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des ZIKV-IgM-IC-ELISA. ....	84
<b>Abbildung 26:</b> Analyse der ZIKV diagnostizierten Patientenseren. ....	86
<b>Abbildung 27:</b> Vergleich des ZIKV-IgM-IC-ELISA mit einem kommerziellen anti-Zika IgM-ELISA von Euroimmun. ....	87
<b>Abbildung 28:</b> Intra- und Inter-Assay Variation des CCHFV-IgM-IC-ELISA. ....	89
<b>Abbildung 29:</b> Einfluss von Störfaktoren auf den CCHFV-IgM-IC-ELISA. ....	90
<b>Abbildung 30:</b> Sensitivität und Spezifität des CCHFV-IgM-IC-ELISA, ermittelt mit einem 179 großen Serumpanel. ....	92

---

<b>Abbildung 31:</b> Analyse von 32 humanen Seren von 14 Patienten aus dem Kosovo. ....	95
<b>Abbildung 32:</b> Analyse von 2 aufeinanderfolgenden Serumproben von 3 Zeburindern aus Kamerun. ....	96
<b>Abbildung 33:</b> Schnelltest, basierend auf Latexpartikelaggregation. ....	98

# 1 Einleitung

„**Virusdiagnostik kann Leben retten.**“ Dieser Satz gewinnt in der heutigen Zeit von Globalisierung und internationaler Migration immer mehr an Bedeutung [1]. Scheinbar exotische Viren wie das Ebolavirus oder das Zika-Virus (ZIKV) gehören nach den aktuellen Ausbrüchen 2014 in Westafrika (Ebolavirus) und 2015 in Brasilien (ZIKV) zu Virusinfektionen, die die ganze Welt betreffen. Die WHO macht aktuell durch das Programm „*R&D Blueprint*“ darauf aufmerksam, dass die Wissenschaft sich auf solche Gefahren vorbereiten muss, um ein schnelles Reagieren zu ermöglichen. Die Entwicklung von diagnostischen Testsystemen zum Nachweis akuter Virusinfektion ist dabei ein wesentlicher Bestandteil dieses Programms [2].

## 1.1 Arboviren

### 1.1.1 Ausbreitung von Arboviren

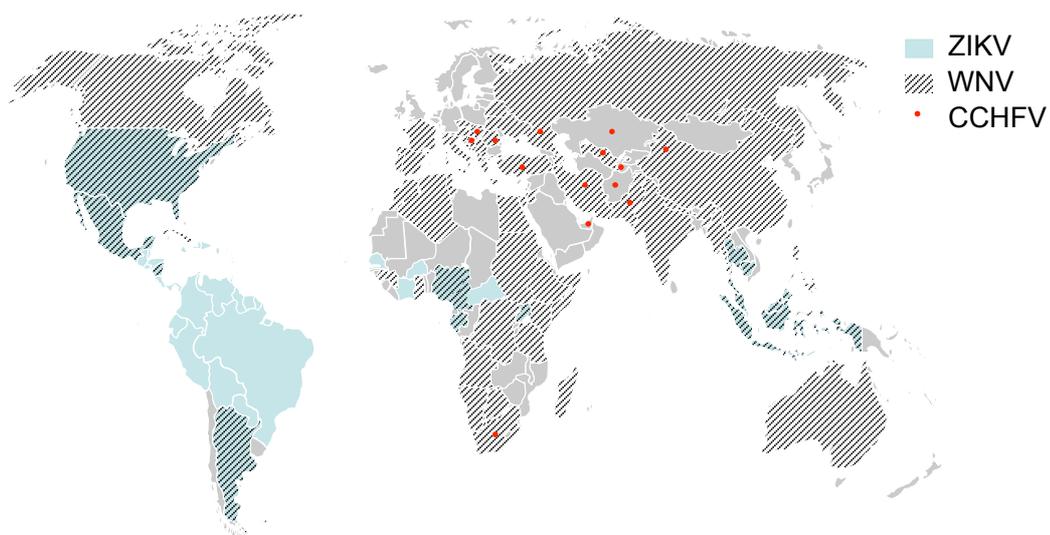
Zu den Arboviren gehören Viren, die durch Gliederfüßer (Arthropoden) wie Stechmücken und Zecken übertragen werden. Zu dieser Virusgruppe zählen über 500 Viren [3], von denen 100 als humanpathogen bekannt sind [4]. Die Arboviren werden in vier Virusfamilien unterteilt: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* und *Reoviridae* [4].

Jahrzehntelang wurde der globalen Ausbreitung flaviviraler Erkrankungen aufgrund ihrer bis dato weitestgehend milden Symptomatik (Fieber, Hautausschlag, Muskelschmerzen, Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen) eine geringe Bedeutung zugewiesen. Dies änderte sich in den letzten 50 Jahren mit den unerwartet auftretenden Epidemien durch Arboviren, wodurch sich vor allem das ZIKV von einem unbeachteten Virus zu einem international relevanten Gesundheitsthema entwickelte (Abb. 1) [5]. Die Ursachen für die Entstehung von Epidemien mit weitreichendem Einfluss liegen zum einen in der hohen Evolutionsgeschwindigkeit der Viren und der damit verbundenen Möglichkeit der Erschließung neuer Habitate. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die genetische Variabilität des Virus, diese ermöglicht eine schnelle Anpassung an verwandte Vektoren mit neuen globalen Verbreitungsmöglichkeiten [6].

Zum anderen wird der Klimawandel als weitere Ursache stark diskutiert [1, 5, 7]. Aus dem 5. Report des Weltklimarates geht hervor, dass seit 1850 die Erderwärmung mit jedem Jahrzehnt zugenommen hat. So stieg die globale mittlere Oberflächentemperatur (Ozeane und Festland) um 0,85 °C an [8]. Dies hat vor allem auf die wechselwarmen Vektoren im Hinblick auf Virusreplikation und Vektorpräsenz Auswirkungen. Zum Beispiel wurde der Ausbruch des Krim-Kongo-Hämorrhagischen-Fieber-Virus (CCHFV) in der Türkei 2005 mit einem vorangegangenen milden Frühling in Zusammenhang gebracht. Durch die mittlere Durchschnittstemperatur oberhalb von 5 °C über einen

längeren Zeitraum ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich dies positiv auf die Zeckengattung *Hyalomma* ausgewirkt hat, den Hauptüberträger des CCHFV [8, 9]. Die Globalisierung, die zunehmende internationale Mobilität und der Handelsverkehr transportieren Vektoren zusätzlich unbeabsichtigt in neue Gebiete [1, 5]. Hierdurch haben sich vor allem Stechmückenarten, wie die asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*) in Europa ausbreiten können. Die *Ae. albopictus* gilt als einer der effizientesten Arbovirusvektoren und ist einer der Hauptüberträger des Dengue-Virus [8, 10, 11]. Das Vorkommen dieser invasiven Stechmückenart wurde bereits in 25 europäischen Ländern nachgewiesen, vor allem im Mittelmeerraum [8]. Die Ausbreitung vom ursprünglichen Lebensraum in den Wäldern Südostasiens ist in erster Linie auf den Schiffshandel von gebrauchten Autoreifen, die den Stechmücken als Brutstätten dienten, zurückzuführen [12, 13]. *Ae. albopictus* ist ein Container-Brüter, dem kleine wassergefüllte Behälter wie Dosen, Autoreifen etc. zum Brüten ausreichen [14]. Die Kombination aus den vermehrt auftretenden Stechmücken und der zunehmenden Populationsdichte (Mensch), u.a. durch Urbanisierung, führt zu einem erhöhten Infektionsrisiko und damit zur Entstehung von Epidemien [15, 16].

Die vielfältigen Ursachen machen es nahezu unmöglich, die Ausbreitung von Arboviren, primär Flaviviren, zu verhindern [11] und deuten darauf hin, dass auch in Zukunft unerwartete Virusepidemien auftreten können. Dadurch gewinnt eine schnelle, sensitive und spezifische Diagnostik an Bedeutung, um den ursächlichen Virus schnell erkennen und Gegenmaßnahmen ergreifen zu können.



**Abbildung 1: Weltweite Ausbreitung der in dieser Arbeit relevanten Arboviren.** In der Weltkarte wurde die aktuelle Ausbreitung des Zika-Virus (ZIKV, grün), West-Nil-Virus (WNV, gestrichelt) und des Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCFV, roter Punkt) eingezeichnet. Die der Weltkarte zugrunde liegenden Daten stammen für das ZIKV aus 2017 [17, 18], für das WNV aus 2014 [19] und für das CCHFV aus 2008 [20].

### 1.1.2 Flavivirus

Die Flaviviren sind ein Genus der Virusfamilie Flaviviridae und gehören zur Gruppe der Arboviren. Bis heute sind 53 Virusspezies bekannt. Die humanpathogenen Vertreter werden durch Stechmücken oder Zecken auf Vertebraten übertragen [4, 7]. Flavivirus-Infektionen sind Zoonosen, die in der Natur von der Virusreplikation in Tieren abhängig sind. Die Infektion von Menschen ist hierbei oft zufällig und durch die häufige Entwicklung einer geringen Virämie gilt der Mensch als Endwirt [4].

Flaviviren besitzen eine lipidumhüllte, ikosaedrische Struktur mit einem Durchmesser von 40-50 nm (Abb. 2A) Das Virusgenom ist ein positiv-strängiges RNA-Genom (10-11 kb) und kodiert für 10 Proteine, die als Polyprotein synthetisiert und von viralen als auch zellulären Serinproteasen prozessiert werden (Abb. 2B) [21]. Infolgedessen entstehen 3 Strukturproteine (C, M, E) und 7 Nicht-Strukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [4]. Die Strukturproteine sind für die Bildung des Viruspartikels von essentieller Bedeutung, während die Nicht-Strukturproteine an der Virusreplikation und der Viruspartikelbildung beteiligt sind. M- und E-Proteine sind integrale Membranproteine, die wichtige Funktionen bei der Virusaufnahme innehaben. Das E-Protein bildet die äußerste Schicht und induziert durch den direkten Kontakt mit dem Immunsystem des Wirtes die humorale Immunantwort [22]. Es besteht aus den extrazellulären Domänen ED1, ED2 und ED3 und wird häufig als Antigen in diagnostischen Tests eingesetzt. Die ED3-Domäne befindet sich am C-terminalen Ende des E-Proteins und enthält virusspezifische Epitope.

[4, 21, 22]. Bei der Virusreplikation werden zunächst unreife, nicht-infektiöse Partikel (60 nm) gebildet, die auf ihrer Oberfläche prM-E-Heterodimere präsentieren. Durch die proteolytische Abspaltung des prM werden die unreifen Partikel in reife umgewandelt. Bei den reifen, infektiösen Viruspartikeln kommt es zu einer Neuorganisation der E- und M-Proteine, die eine glatte Virusoberfläche zur Folge hat [4].

Das Nicht-Strukturprotein 1 (NS1) wird in großen Mengen aus infizierten Zellen freigesetzt und induziert ebenfalls eine Immunantwort. Die Verwendung von rekombinantem NS1 als Antigen in diagnostischen Tests wird immer häufiger zur Detektion von Flavivirus-Infektionen eingesetzt [23, 24]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, das NS1 in Antigen Tests bei der Identifikation von z.B. frühen Dengue-Virus-Infektionen nachzuweisen [25].

Die Pathogenese ist virusspezifisch, viele Infektionen verlaufen asymptomatisch oder es kommt zu Fiebererscheinungen. Für Flavivirus-Infektionen gibt es keine virusspezifische Behandlung, eine Therapie ist nur unterstützend [11]. Eine wirksame aktive Immunisierung ist möglich gegen Gelbfieber, Frühsommer-Meningoenzephalitis und Japanische Enzephalitis, gegen zahlreiche andere Flavivirus-Infektionen befinden sich

die Impfstoffe noch im Entwicklungs- bzw. Erprobungsstadium [1]. Die neuste Impfstoffentwicklung ist „Dengvaxia“ von Sanofi Pasteur Ltd, ein Impfstoff zur Immunisierung gegen das Dengue-Virus [26]. Dies wurde im Dezember 2015 zugelassen und wird mittlerweile in 11 Ländern im asiatischen und lateinamerikanischen Raum eingesetzt [27]. Ein optimaler Schutz gegen die Folgen einer Dengue-Virus-Infektion ist jedoch stark abhängig vom Alter des Patienten und der lokalen Transmissionsintensität des Virus [26, 28].

Der effektivste Schutz gegen eine Infektion ist die Stechmücken-Expositionsprophylaxe im Besonderen in endemischen Gebieten, hierzu gehören u.a. das Tragen von dicht abschließender Kleidung, die Verwendung von pyrethroidimprägnierten Moskitonetzen und Insektiziden [1].

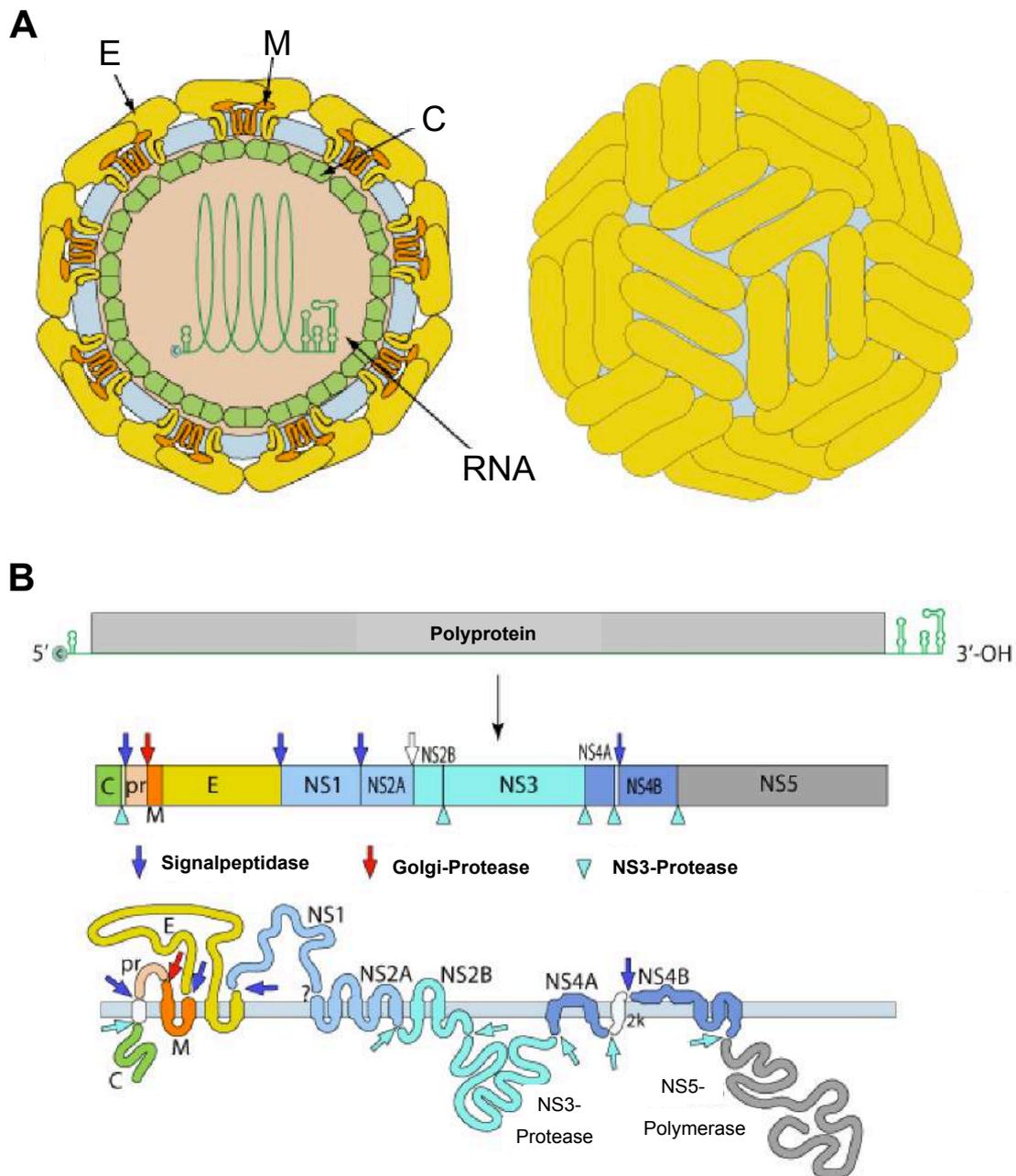


Abbildung entnommen aus [29]

### Abbildung 2: Struktur und Genom des Flavivirus.

**(A) Struktur.** Das reife Viruspartikel besitzt eine ikosaedrische Struktur mit einer Größe von 40-50 nm. Das Viruspartikel ist von einer Lipidhülle umgeben, in der Hüllproteine (E) und Membranproteine (M, Vorläuferprotein prM) eingelagert sind. Das E-Protein ist an der Virusoberfläche lokalisiert und induziert die Bildung von neutralisierenden Antikörpern im humanen Wirt. Es ist verantwortlich für die Rezeptorbindung sowie für die Membranfusion und besteht aus 3 Domänen (ED1, ED2, ED3). Das Kapsid (ca. 30 nm) besteht aus dem C-Protein und beinhaltet die genomische RNA.

**(B) Genom.** Das Genom besteht aus einer positivsträngigen RNA. Die RNA besitzt einen offenen Leserahmen. Dieser wird von zwei nicht translatierten Sequenzen (regulatorische Funktionen) flankiert und weist eine Typ I Cap-Struktur am 5'-Ende auf. Die Translation ist Cap-abhängig. Durch Translation entsteht ein Polyprotein, das durch Co- und Posttranslationale Modifikationen in 10 Proteine gespalten wird, 3 Strukturproteine (C, M, E) und 7 Nicht-Strukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Das NS1 Protein besitzt eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation und wird von infizierten Zellen freigesetzt, wodurch es eine protektive Immunantwort auslösen kann. [4, 21, 22, 29]

### 1.1.2.1 West-Nil-Virus (WNV)

Das WNV gehört zur Gattung der Flaviviren in der Familie der Flaviviridae. Aufgrund seiner serologischen und molekularbiologischen Struktur wird es in den Japan-Enzephalitis-Serokomplex eingeordnet [1, 21]. Das Virus wurde ursprünglich 1937 in Uganda aus dem Blut einer fiebernden Frau isoliert [30]. In den 60er-Jahren trat das Virus erstmals in Europa in Erscheinung. Es folgten größere Ausbrüche in Rumänien (1996), Russland (1999) und Griechenland (2010) [31, 32]. 1999 kam es in der westlichen Hemisphäre (USA) zu einer WNV-Epidemie [33]. Heutzutage gehört das WNV zu den am weitesten verbreiteten Arboviren (Kapitel, 1.1.1, Abb. 1) mit saisonal erfassten Epidemien und Epizootien bei Pferden [1, 11, 21]. Bisher werden weltweit zwei humanpathogene WNV-Hauptlinien unterschieden [34]. Linie I ist pathogener und in einem größeren geografischen Raum (Afrika, Europa, Australien, Asien, Amerika) vertreten. Die Linie II tritt vor allem in Afrika, südlich der Sahara, auf und die humane Pathogenität ist relativ gering [11]. Allerdings wird bereits diskutiert, die ursprüngliche Klassifizierung aufgrund bekannter phylogenetischer Unterschiede einiger Isolate zu erweitern [30].

Das Virus wird hauptsächlich durch Stechmücken der Gattung *Culex* auf Vögel übertragen und besitzt das Potential, in Stechmücken zu überwintern. Der Mensch und auch andere Säugetiere werden zufällig infiziert und zählen zu den Endwirten [11]. Sie entwickeln eine geringe Virämie, wodurch eine Rückübertragung des Virus auf Stechmücken nicht möglich ist [35]. Infektionen durch Bluttransfusionen, Organtransplantationen oder Aerosole WNV-haltiger Flüssigkeiten sind ebenfalls bekannt [21, 35].

WNV-Infektionen verlaufen zu 80 % asymptomatisch, nur in 20 % der Fälle kommt es zu grippeähnlichen Symptomen. Bei einer von 150 Infektionen (unter 1 %), insbesondere bei älteren Menschen, kann es zu einem schweren Verlauf mit neurologischen Symptomen unterschiedlichen Schweregrades kommen (Enzephalitis, Meningitis) [21, 35].

Ein Impfstoff ist in der Veterinärmedizin bereits vorhanden, dieser wird erfolgreich bei Pferden eingesetzt, für den Menschen gibt es bisher keinen Impfstoff [11, 21].

### 1.1.2.2 Zika-Virus (ZIKV)

Das ZIKV gehört zur Gattung Flavivirus in der Familie der Flaviviridae und wird in den Spondweni-Virus-Serokomplex eingruppiert [36]. 1947 wurde das ZIKV erstmals aus einem Rhesusaffen im Zika-Wald in Uganda isoliert. 60 Jahre lang war das ZIKV weitestgehend unbekannt und nur 13 Fälle von humanen Infektionen wurden in Afrika und Südostasien registriert. Erst 2007 mit einem kleinen Ausbruch in Yap, einem Bundesstaat der Föderierten Staaten von Mikronesien, trat das ZIKV außerhalb von Afrika und Asien in Erscheinung. Anschließend verbreitete sich das Virus über Französisch Poly-

nesien (2013), den Osterinseln (2014) bis das ZIKV 2015 in Südamerika nachgewiesen wurde [36-38]. Durch die Epidemie in Brasilien wurde das ZIKV weltweit bekannt. Es wird von 440.000-1300.000 symptomatischen ZIKV-Infektionen ausgegangen [37]. Bei 80 % der ZIKV infizierten Patienten treten keine Symptome auf. Bei einem typischen, symptomatischen Verlauf kommt es zu grippeähnlichen Symptomen [36]. Während des Ausbruchs in Brasilien wurden die ZIKV-Infektionen erstmals mit Missbildungen bei Neugeborenen (Mikrozephalie) in Zusammenhang gebracht, die in dieser Zeit vermehrt auftraten [39, 40]. Das während des ZIKV-Ausbruchs in Französisch Polynesien häufiger auftretende Guillian-Barré-Syndrom bei Erwachsenen wurde in Brasilien ebenfalls beobachtet [39, 41]. Durch das bis dato unbekanntes Potential des Virus, schwerwiegende Krankheiten hervorzurufen, erklärte die WHO am 1. Februar 2016 eine gesundheitliche Notlage von internationaler Tragweite. Durch den Rückgang von ZIKV-Infektionen konnte diese am 18. November 2016 wieder aufgehoben werden [42].

Bislang sind zwei ZIKV Hauptlinien bekannt [36]. Dazu gehören die afrikanische und die asiatische Linie. Letztere wird für die Ausbrüche in Yap, Französisch Polynesien und Amerika verantwortlich gemacht [36]. Das ZIKV zirkuliert weitestgehend innerhalb eines sylvatischen Zyklus zwischen Mücken und Nicht-Primaten. Menschen zählen zu den Endwirten [36]. *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* sind jedoch die einzigen bekannten *Aedes* Spezies in Nord- und Südamerika, wodurch ein urbaner Übertragungszyklus des Virus für möglich gehalten wird [39]. Hinweise auf sexuelle und vertikale Transmission (Mutter-Neugeborene) zeigen, dass auch eine Stechmücken-unabhängige Weitergabe wahrscheinlich ist [36]. Zum Schutz gegen das ZIKV gibt es bisher keinen Impfstoff und es ist keine virusspezifische Behandlung bekannt [37].

### 1.1.3 Nairovirus

Das Nairovirus ist eine Gattung der Familie der Bunyaviridae [4]. Zu den Nairoviren gehören über 34 vorwiegend durch Zecken übertragene Viren, die Infektionskrankheiten in Menschen und Tieren auslösen können [43, 44]. Schildzecken (Familie *Ixodidae*) und Lederzecken (Familie *Argasidae*) sind die typischen Vektoren von Nairoviren, welche durch einen Biss Menschen und Tiere infizieren können [43]. Über einen engen Kontakt mit infizierten Nutztieren oder infizierten Personen ist durch Körperflüssigkeiten ebenfalls eine Ansteckung möglich [44]. Das CCHFV, das Dugbe-Virus und das Virus der Nairobi-Schaf-Krankheit sind die bekanntesten humanpathogenen Vertreter, die Pathogenität vieler anderer Viren dieser Gattung ist nicht bekannt [11, 43, 45].

Die Negativstrang-RNA Viren sind lipidumhüllt, besitzen eine sphärische Struktur (80-120 nm) und ein segmentiertes Genom (Abb. 3) [4]. Die genomische RNA ( $\approx 18,8$  kb) liegt in drei Segmenten vor: das L-Segment kodiert für die RNA-Polymerase ( $\approx 12,2$  kb), das M-Segment kodiert für 2 Oberflächen Glykoproteine ( $\approx 4,9$  kb) und das S-Segment

( $\approx 1,7$  kb) kodiert für das Nukleoprotein N [21, 45]. Zusätzlich besitzt das Genom ein charakteristisches 3'-Ende (AGAGUUUCU) und 5'-Ende (AGAAACUCU) [45]. Das Nukleoprotein ist das am häufigsten auftretende virale Produkt in infizierten Zellen und besitzt wichtige Funktionen in der viralen Replikation [46]. Es induziert eine frühe, starke und lang anhaltende Immunantwort, wodurch das Nukleoprotein sehr oft als Antigen in serologischen Tests eingesetzt wird [47].

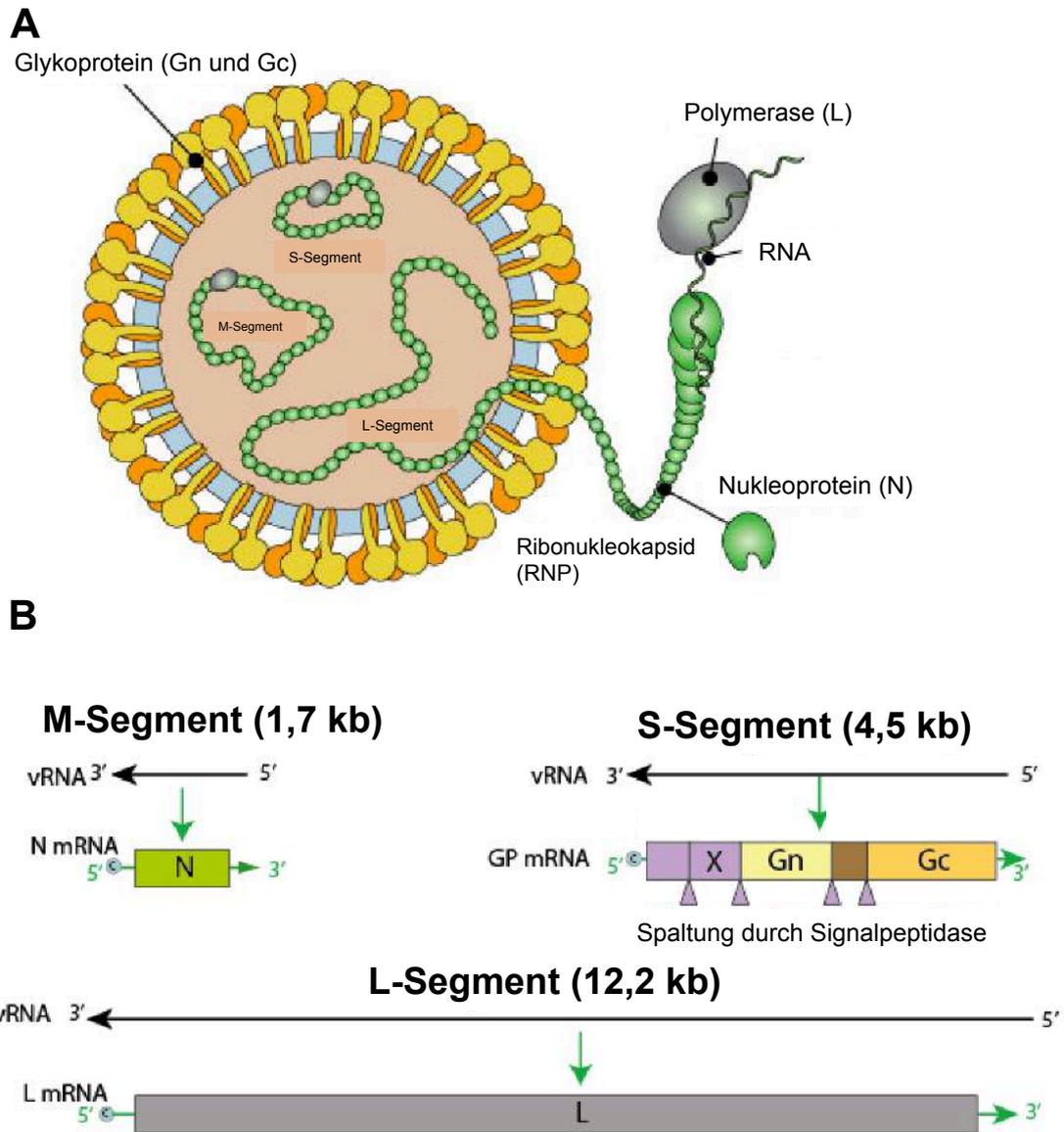


Abbildung entnommen aus [29]

**Abbildung 3: Struktur und Genom des Nairovirus.**

**(A) Struktur.** Die sphärischen Viruspartikel sind mit einer Lipidmembran umhüllt und enthalten im Inneren die an N- und L-Proteine gebundenen RNA-Segmente.

**(B) Genom.** Die segmentierte Negativstrang RNA besteht aus drei Segmenten: L-Segment (kodiert multifunktionale L-Protein), M-Segment (kodiert 2 Oberflächen-Glykoproteine) und S-Segment (kodiert Nukleoprotein N). [4, 21, 29]

### 1.1.3.1 Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV)

Das CCHFV gehört zur Gattung der Nairoviren in der Familie der Bunyaviren. 1944 infizierte sich ein sowjetischer Soldat auf der Insel Krim mit dem zum damaligen Zeit-

punkt noch unbekanntem CCHFV. Im Jahr 1967 gelang erstmals die Isolierung des Krim-Virus, das zu dem einige Zeit zuvor entdeckten Kongo-Virus identisch war. Dies wurde in der Namensgebung berücksichtigt [4]. Die CCHFV-Infektion ist die am weitesten verbreitete, durch Zecken übertragende virale Infektion. Es sind Fälle im Westen von China, Südasien, Ost- und Südosteuropa und Afrika bekannt (Kapitel 1.1.1, Abb. 1). In diesen Gebieten zirkulieren unterschiedlich pathogene Stämme, wobei die im Bereich des Balkans weniger pathogen sind. Die geografische Verbreitung entspricht im weitesten dem der Zecken, darunter zählt die Hyalomma-Zecke als Hauptüberträger [1, 4, 21]. Das Virus durchläuft vorwiegend den enzoonotischen Zyklus zwischen Vertebraten-Wirten wie hasenartigen Nagern und Zecken. Der Mensch kann sich jedoch über einen Zeckenbiss, aber auch durch den Kontakt mit Blut, Körperflüssigkeiten oder Gewebe infizieren [11, 21]. Eine besonders hohe Infektionsgefahr besteht bei der Übertragung des CCHFV von Nutztieren auf den Menschen. Tiere sind nur kurz virämisch, zeigen aber keine Krankheitssymptome, wodurch sich Menschen unbewusst infizieren können [1, 11]. Nosokomiale Ausbrüche mit hoher Letalität zeigten, dass auch eine Übertragung von Mensch zu Mensch möglich ist. Eine typische CCHFV-Infektion verläuft in 3 Phasen: prähämorrhagisch, hämorrhagisch (bei schweren Verläufen) und rekonvaleszent [1]. Zu Beginn treten grippeähnliche Symptome in Erscheinung, je nach Virusstamm klingt das Krankheitsbild schnell wieder ab oder es bildet sich hämorrhagisches Fieber aus. Bei mehr als 25 % der Infizierten kommt es dann zu petechialen Blutungen der Haut und mukösen Membranen. Die Letalität liegt bei 10-50 %. Bei letalen Verläufen ist die Virämie deutlich höher als bei einem normalen Krankheitsverlauf und es werden keine Antikörper gegen das Virus gebildet [1, 11, 21]. Eine Therapie ist nur unterstützend durch die Behandlung der Symptomatik möglich. Eine Behandlung mit Ribavirin ist zu erwägen und befindet sich auf dem Prüfstand [21]. Es gibt einen Impfstoff gegen das CCHFV (aus dem Gehirn von Mäusen gezüchtet, Chloroform inaktiviert und hitzeinaktiviert, CCHFV Stamm V42/81). Dieses wird in Bulgarien produziert und wurde 1970 in der Sowjetunion entwickelt. In einer Studie aus 2012 wurde jedoch eine unzureichende klinische Wirkung des Impfstoffes nachgewiesen, wodurch die Notwendigkeit eines Impfstoffes weiter besteht [48].

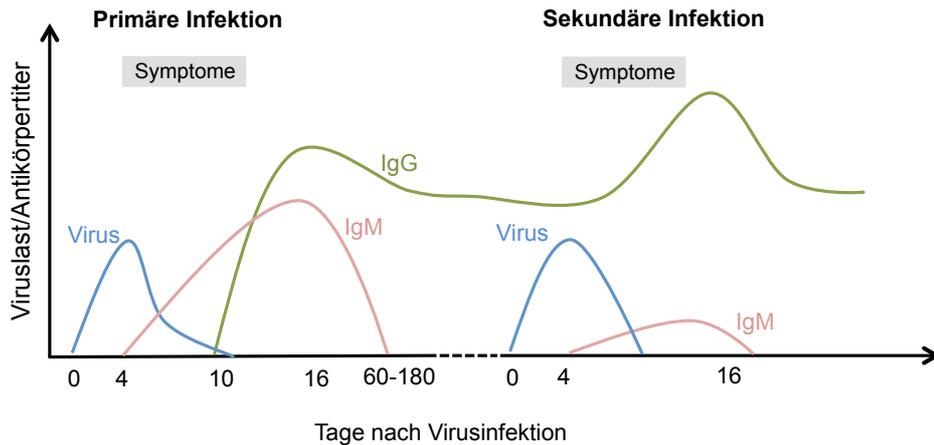
#### **1.1.4 Diagnostik von Arbovirus-Infektionen**

Nach einer Virusinfektion des humanen Organismus (Abb. 4) beginnt das Stadium der Virämie, die Dauer ist virusspezifisch, meistens jedoch sehr kurz [49]. Das Virus, virale Proteine oder das virale Genom können in dieser Zeit direkt durch PCR oder durch Virusisolierung nachgewiesen werden. Die Virusisolierung innerhalb der virämischen Phase ist zeitaufwändig (7-14 d) und teuer, zusätzlich erfordert es meistens einen erhöhten Sicherheitsstandard der Stufe BSL 2/3/4 [4]. Sie gilt jedoch weiterhin als Gold-

standard in der Virusdiagnostik. Eine weitere Schwierigkeit beim direkten Virusnachweis besteht darin, dass die klinischen Symptome einer Virusinfektion meistens erst dann auftreten, wenn das Virus nicht mehr im Blutkreislauf nachzuweisen ist [50]. In der Routinediagnostik wird daher in vielen Fällen das virale Genom mittels PCR nachgewiesen, da es über einen längeren Zeitraum untersucht werden kann. Das Problem von falsch positiven Resultaten durch Nukleinsäure-Kontamination ist der bekannteste Nachteil der PCR-Methode [4, 49, 50].

Die IgM-Antikörper (IgM-Ak) bilden die erste Immunantwort im humanen Organismus und sind ab Tag 4-7 nach Eintreten der klinischen Symptome nachweisbar (Abb. 4). Die Detektion von IgM-Ak ermöglicht den Nachweis einer akuten Virusinfektion [4]. Sie persistieren wenige Wochen im menschlichen Körper, können jedoch auch bei einigen Virusinfektionen nach Monaten (CCHFV) oder Jahren (WNV) beobachtet werden [49]. Die IgG-Antikörper (IgG-Ak) zählen zur sekundären humoralen Immunantwort und können nach ca. 8-10 Tagen nach Beginn der Erkrankung detektiert werden (Abb.4). Sie persistieren langfristig (Jahre) und dienen zum Schutz vor einer erneuten Infektion. Der Nachweis eines 4fachen IgG-Antikörperanstieg in zwei konsekutiven Seren (entnommen im Abstand von 10-14 Tagen) kann auf eine akute Virusinfektion hinweisen. IgG-Antikörper im Allgemeinen deuten jedoch auf eine frühere Virusinfektion hin oder dienen zur Kontrolle des Immunstatus [4, 49, 50].

Bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Virus oder auch engverwandten Viren steigt der IgG-Titer deutlich schneller und höher an, wohingegen der IgM-Titer meistens schwach oder gar nicht nachweisbar ist (Abb. 4) [4]. Patienten, die zuvor z.B. mit einem anderen Flavivirus infiziert oder geimpft wurden, bilden bei einer erneuten Infektion oft Antikörper gegen die vorherige Infektion aus, was wiederum zu Fehldiagnosen führen kann [39]. Dieses Phänomen wird als „Antigenerbsünde“ bezeichnet und führt vor allem im Genus der Flaviviren zur serologischen Kreuzreaktivität.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufes nach einer Virusinfektion.** Bei einer primären Virusinfektion (Erstinfektion) ist die Viruslast im Serum für einen kurzen Zeitraum über direkte Methoden (PCR, ELISA, Virusisolierung, Hybridisierung) nachweisbar. Mit dem Eintreten der Symptome werden die IgM-Antikörper durch serologische Nachweismethoden detektierbar. Die IgM-Antikörper persistieren meistens für einen kurzen Zeitraum im Menschen, der Zeitraum ist viruspezifisch. Die IgG-Antikörper können nach ca. 10 Tagen nach Eintreten der Symptome im Serum nachgewiesen werden und persistieren langfristig. Bei einer Re-Infektion/Sekundärinfektion kommt es zu einem erneuten Anstieg des IgG-Titers. Der IgM-Titer steigt dagegen nur schwach und in einigen Fällen gar nicht an. [4, 49, 50]

Für die serologische Diagnostik von Virusinfektionen werden häufig *Enzym-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), Immunfluoreszenz Technik (IFT) oder Neutralisationsteste eingesetzt. Die gängigsten Methoden sind der ELISA oder die IFT. Durch eine enge Verwandtschaft innerhalb der Virusgattungen (z.B. Flaviviren) kann es in diesen Tests zu falsch-positiven Ergebnissen durch kreuzreaktive Antikörper kommen [5]. Der Neutralisationstest ist bekannt für eine hohe Spezifität, erfordert aber das Arbeiten mit infektiösen Viren und ist dadurch nur einigen Speziallabors vorenthalten. Die Entwicklung von Schnelltestsystemen auf Basis der etablierten Nachweismethoden ermöglicht den schnellen Virusnachweis (innerhalb einer Stunde) und damit schnellstmögliche Patientenbehandlung. Die angestrebte einfache Handhabung ermöglicht eine Diagnostik außerhalb von speziellen Labors. Dadurch gewinnt die Point of Care Diagnostik auch im Bereich der Virusdiagnostik immer mehr an Bedeutung [51].

### 1.1.5 Testentwicklung von In-vitro Diagnostika (IVD)

Die in den letzten Jahren auftretenden Virusepidemien mit teilweise schweren gesundheitlichen Folgen (ZIKV-Epidemie 2015/2016) zeigen wie wichtig es ist, im Zeichen der zunehmenden Globalisierung vorbereitet zu sein. Dazu gehört u.a. eine gute Diagnostik, um die Ursache einer Epidemie und mögliche Behandlungsstrategien schnell entwickeln zu können.

Für viele tropische Virusinfektionen sind dennoch keine kommerziellen Testkits vorhanden [4], daher beruht die Diagnostik vieler seltener, viraler Erreger auf *in-house* etablierten Testsystemen [52]. Die Entwicklung von Testkits in der EU erfordert die Einhaltung der umfangreichen Richtlinien der *in vitro* Diagnostik für kommerzielle Diagnostika (EU-Richtlinie 98/79/EG). Dies ist die Grundvoraussetzung für eine CE-Kennzeichnung und damit die Kommerzialisierung als Testsystem für die medizinische Diagnostik. IVD in der Entwicklung können mit dem Zusatz RUO (*research use only*) an Forschungslabore bereits ohne CE-Markierung weitergegeben werden. Allerdings müssen diese Tests speziell gekennzeichnet werden und ein Einsatz in der medizinischen Diagnostik ist nicht zulässig [53]. Mit der Konformitätsbewertung weist der IVD-Hersteller nach, dass die Anforderungen des Medizinproduktegesetzes bzw. die relevanten EU-Richtlinien erfüllt werden [54]. Diese beinhaltet u.a. den Nachweis der Reproduzierbarkeit und Präzision durch die Bestimmung von Inter- und Intra-Assay-Variation, den Nachweis der Langzeitstabilität der eingesetzten Testkitbestandteile, die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität unter Verwendung eines repräsentativen Serumpanels sowie der Ausschluss von Interferenzen durch hämolytische, lipämische oder auch ikterische Proben. Mit der ausführlichen Dokumentation der Entwicklungs- und Herstellungsprozesse können bei einem Audit alle wichtigen Kriterien nachgewiesen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Arbeiten nach klar definierten Richtlinien, die für eine gleichbleibende Qualität sorgen und durch ein eigenes Qualitätsmanagementsystem nach EN ISO 13485:2016 vorgegeben werden [54-56]. Ein nach EN ISO 13485:2016 zertifiziertes Labor kann die Produktion von standardisierten Testkits mit zuverlässigen Messergebnissen nachweisen, die auch von unerfahrenen Laboren eingesetzt werden können [4]. Die durch die Validierung ermittelte Sensitivität (Wahrscheinlichkeit, dass positive Proben als positiv erkannt werden) und Spezifität (Wahrscheinlichkeit, dass negative Proben als negativ detektiert werden) sowie mitgelieferte Standardkontrollen ermöglichen eine verlässliche Auswertung der Testergebnisse für jeden Kunden.

Im Bereich der Diagnostik von tropischen Infektionskrankheiten ist ein wirtschaftlicher Wert nicht immer auf Anhieb erkennbar [51]. In den Industrieländern handelt es sich oft nur um vereinzelt auftretende Fälle, wohingegen es in endemischen Gebieten zu hohen Fallzahlen kommt, jedoch dort eine geringe Finanzkraft und ein schlechtes Gesundheitssystem vorhanden ist. Dadurch ist die Forschung auf diesem Gebiet nur auf eine geringe Anzahl von Laboren begrenzt [57]. Allerdings ist das Potential von weniger erforschten Viren wie z.B. beim St. Louis Enzephalitis Virus durchaus groß, eine unvorhergesehene Epidemie auszulösen [57]. Dadurch und auch aus humanitären Gründen ist die Entwicklung von Diagnostika in weniger wirtschaftlichen Forschungs-

bereichen als Vorbereitungsmaßnahme enorm wichtig. Für die Diagnostik von ZIKV-Infektionen war der erste kommerziell erhältliche serologische Test von der Euroimmun AG ab Januar 2016 erhältlich [58], zu diesem Zeitpunkt war die Epidemie bereits weit fortgeschritten [36-38]. Mittlerweile bieten viele Firmen serologische Testkits zum Nachweis von ZIKV-Infektionen an (Abb. 5), jedoch wurden nur bei wenigen (z.B. Euroimmun) die Validierungsdaten veröffentlicht [59]. In der folgenden Abbildung 5 ist eine Übersicht der im Juni 2017 kommerziell erhältlichen Testkits für das CCHFV, WNV und ZIKV aufgelistet.

	CCHFV	WNV	ZIKV	Land
<b>Unternehmen</b>				
Abbexa Ltd	x	x		UK
Abcam®			x	UK
Alpha Diagnostics Intl. Inc.	x	x	x	US
Creative Diagnostics	x	x	x	US
CTK Biotech			x	US
Diagnostics Automation/Cortez Diagnostics Inc.		x		US
DiaSorin			x	ITA
DRG International Inc		x		US
Euroimmun		x	x	DE
Focus Diagnostics		x		US
IBL international/ Tecan		x	x	DE/SZ
InBios		x	x	US
MyBioSource			x	US
NovaTec			x	DE
Vector Best	x			RU
Virion/Serion		x		US
<b>Gesundheitsorganisationen</b>				
CDC			x	US

Stand Juni 2017

Abbildung 5: Tabellarische Übersicht der aktuellen kommerziellen ELISA zur Detektion von CCHFV-, WNV- und ZIKV-Infektionen.

## 1.2 Fc-Rezeptoren

Zu den Rezeptoren, die bei der Antigenerkennung von Immunzellen beteiligt sind, gehören B-Zellrezeptoren, T-Zellrezeptoren und Fc-Rezeptoren [60].

Fc-Rezeptoren (FcR), die das Fc-Fragment der Immunglobuline erkennen, nehmen eine zentrale Rolle beim Schutz des humanen Organismus vor Infektionen ein. Im Laufe der Immunantwort verlinken sie die humorale Immunreaktion mit zellulärer Aktivität (Abb. 6A). Pathogene (z.B. Viren), die in den Blutkreislauf eindringen, können durch Antikörper opsoniert werden. Die dadurch entstehenden Immunkomplexe (IC) aus Antikörpern und Antigenen werden durch Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen erkannt und gebunden [61]. Ferner ist dabei zu erwähnen, dass alle Immunglobuline, mit Ausnahme von IgE, die Fc-Rezeptoren nur besetzen können, wenn sie zuvor ein Antigen gebunden haben. Die daraus resultierende Konformationsänderung verbessert die Bindung von Rezeptor und Immunkomplex [62].

Basierend auf der ausgelösten Funktion werden Fc-Rezeptoren in zwei Hauptgruppen unterteilt. FcR, die vorwiegend durch Leukozyten exprimiert werden und Effektorfunktionen, wie Phagozytose, Zelldegranulation, Produktion von Zytokinen und Chemokinen durch die Bindung von Antikörper-/Antigen-Immunkomplexen auslösen, werden in eine erste Gruppe unterteilt [61, 63]. Bei den durch Leukozyten exprimierten Fc-Rezeptoren handelt es sich um heterooligomere Komplexe, bestehend aus einer spezifischen  $\alpha$ -Kette und verschiedenen Untereinheiten ( $\zeta$ -,  $\gamma$ -,  $\beta$ -Ketten) [61, 64]. Es existieren spezifische Fc-Rezeptoren für alle Ig-Klassen: Fc $\gamma$ R für IgG, Fc $\alpha$ R für IgA, Fc $\epsilon$ R für IgE, Fc $\mu$ R für IgM und Fc $\delta$ R für IgD [61].

Die bekannteste Funktion ist die positive und negative Regulierung der Immunzellen durch Signaltransduktion (Abb. 6B). Die Grundvoraussetzung sind die in der Zytoplasmaregion enthaltenen Tyrosin-Motive. Aktivierende FcR enthalten das Immunrezeptor-Tyrosin-basierte aktive Motiv (ITAM), dieses befindet sich auf der  $\gamma$ -Kette, die mit den meisten Fc-Rezeptoren assoziiert ist. Im Gegensatz dazu befindet sich das Immunrezeptor-Tyrosin-basierte inhibierende Motiv (ITIM) nur in der Zytoplasmaregion des Fc $\gamma$ RIIB, einem inhibierenden Fc-Rezeptor [65, 66].

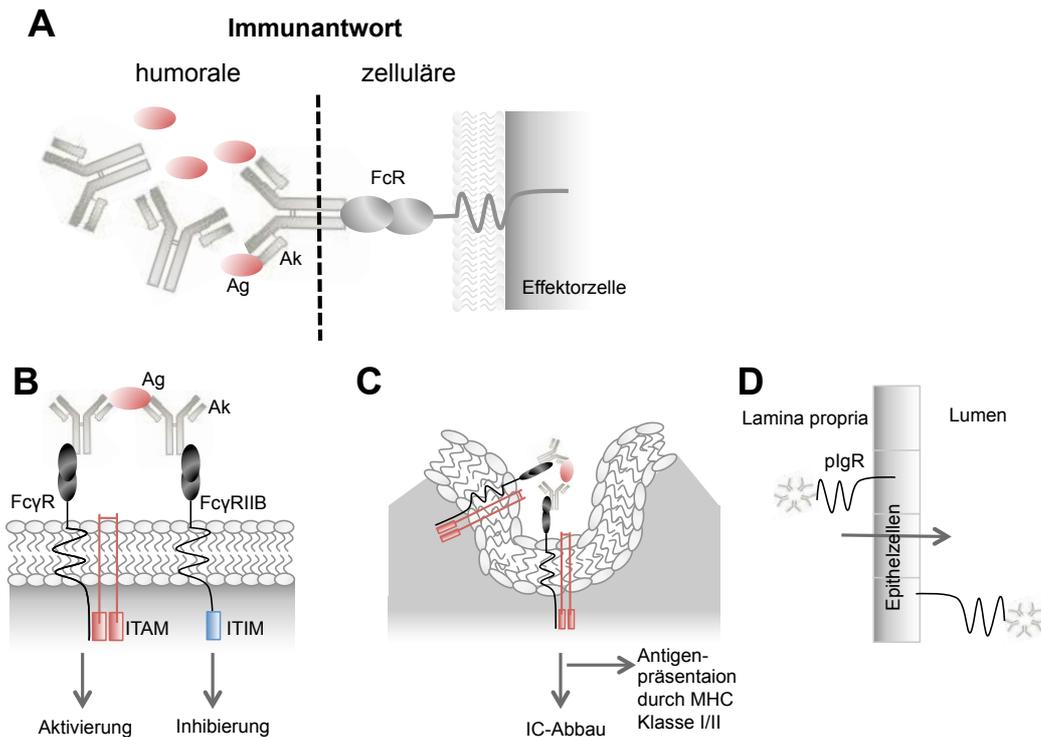
Durch die Quervernetzung der Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Immunzellen werden die Tyrosinreste der Motive durch Kinasen der SRC-Familie phosphoryliert [65]. Nach Phosphorylierung des ITAM kommt es zur Bindung von Kinasen an das Tyrosin-haltige Motiv. Diese werden durch die Bindung aktiviert und können ihrerseits anschließend Zielproteine durch Phosphorylierung aktivieren. Dadurch können zum einen der Calcium und Proteinkinase-C abhängige Signaltransduktionsweg oder der Ras/ Rac vermittelten Signaltransduktionsweg eingeleitet werden [67]. Nach Phosphorylierung des ITIM ergeben sich Bindungsstellen für Phosphatasen, die durch die Bindung aktiviert werden und anschließend Zielproteine innerhalb der erwähnten Signaltransduktionswege durch Dephosphorylierung inhibieren [67].

Die Effektorfunktion, die dabei ausgelöst wird, ist abhängig von dem Fc-Rezeptortyp und der jeweiligen Immunzelle [68]. Die ITAM-ITIM-Regulierung ist ein wichtiger Teil in der Immunabwehr, Störungen führen häufig zu Immunkomplex-vermittelten Autoimmunerkrankungen [65]. Eine weitere Funktion der durch Leukozyten exprimierten Fc-Rezeptoren ist die Rezeptoren-vermittelte Phagozytose oder Endozytose von Immunkomplexen (Abb. 6C). Dadurch kann der Antikörper-Antigen-Komplex entweder in der Zelle abgebaut oder das Antigen über den MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex) Klasse I/II auf der Oberfläche präsentiert werden [65].

Der Transport von Immunglobulinen über Epithelzellen und Endothelzellen zu deren Wirkungsort wird durch FcR einer weiteren Gruppe ermöglicht [61]. Die Rezeptoren poly-IgR (Abb. 6D) und FcRn gehören zu dieser Rezeptorgruppe. Sie ermöglichen den

transzellulären Transport von Antikörpern, eine immunregulatorische Funktion dieser Rezeptoren ist nicht bekannt [65].

In den letzten Jahren gab es Hinweise darauf, dass einige FcR im Blutstrom in einer löslichen Form vorhanden sind und Immunreaktionen auslösen können. Des Weiteren besteht die Vermutung, dass FcR die Differenzierung von Lymphozyten verändern können [65].



**Abbildung 6: Funktionen der Fc-Rezeptoren.**

(A) Die Fc-Rezeptoren stellen die Verbindung zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort durch die Bindung von Antigen-Antikörper-Komplexen dar [65, 69].

(B) Durch die ITAM (Immunrezeptor-Tyrosin-basierte aktive Motiv) und ITIM (Immunrezeptor-Tyrosin-basierte inhibierende Motiv) der Fc-Rezeptoren findet eine aktivierende oder inhibierende Regulation des Immunsystems statt [65]. Zu den aktivierenden Rezeptoren gehört u.a. der im nachfolgenden Kapitel vorgestellte FcγRIIa.

(C) Die Fc-vermittelte Aufnahme von Immunkomplexen führt zum Abbau dieser in der Immunzelle und/ oder ermöglicht die Antigenpräsentation an der Oberfläche [65].

(D) Durch den pIgR und FcRn wird ein transzellulärer Transport der Antikörper ermöglicht. Die IgM-Ak-Bindung an den pIgR bedingt den Transport durch die Epithelzellen ins mukosale Lumen, z.B. innerhalb der Lamina propria des Darms [65, 70].

Ag: Antigen. Ak: Antikörper.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren FcγRIIa und FcμR gehören zu der Gruppe von FcR, die Effektorfunktionen auslösen. Sie werden in den folgenden Kapiteln genauer vorgestellt.

### 1.2.1 FcγRIIa: Fc-Rezeptor für IgG

Die Fc-Rezeptoren, die IgG-Antikörper binden können, gehören zu den am häufigsten vorkommenden Fc-Rezeptoren und besitzen die größte Diversität. Zu dieser Gruppe gehört der FcγRII (CD32). Die Gene *FcγRIIA*, *FcγRIIB* und *FcγRIIC* codieren den FcγRII, der nach alternativem Spleißen in 6 Transkripte unterteilt wird, die drei Isoformen des Rezeptors erzeugen [61]. CD32 ist ein Transmembranprotein Typ I und wird auf Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Plättchen exprimiert [71, 72]. Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Region, die zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig-Domänen) enthält, einer Transmembranregion und einer C-terminalen zytoplasmatischen Region (Abb. 7) [61, 64]. Eine Isoform des FcγRII ist der FcγRIIa (CD32a). Dieser gehört zu der Gruppe von FcR, die eine geringe Affinität zur Fc-Region der IgG-Antikörper aufweisen, zeigt dadurch aber eine effizientere IgG-Immunkomplexbindung [73]. Die Immunglobulin-ähnlichen Domänen des CD32a Rezeptors binden IgG-Antikörper in Form von Komplexen mit Antigenen oder Polymeren [61, 64]. Der FcγRIIa zählt zu den aktivierenden Fc-Rezeptoren (Abb. 6B) [73]. Durch die FcγRIIa-Besetzung mit Immunkomplexen werden durch das auf der  $\gamma$ -Kette enthaltene ITAM (Immunrezeptor-Tyrosin-basierte aktive Motive) Effektorfunktionen ausgelöst, die zur Eliminierung des Pathogen beitragen [62, 68].

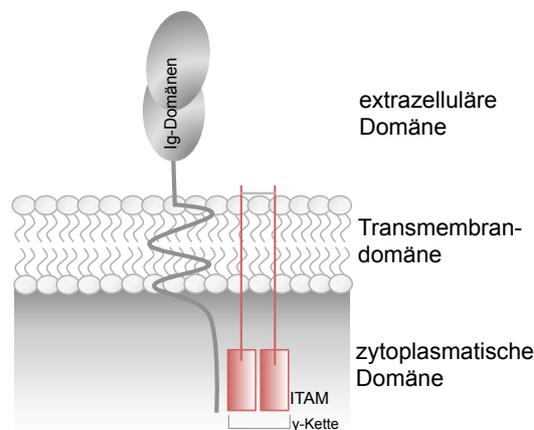


Abbildung 7: Struktur des FcγRIIa. (Abbildung erstellt nach [65, 72])

### 1.2.2 FcμR: Fc-Rezeptor für IgM

2009 wurde erstmals ein bis dato unbekannter Fc-Rezeptor für die Bindung von IgM identifiziert [74, 75]. Durch das funktionelle Screening einer humanen B-Zellen-cDNA Bank wurde der FcμR als ein IgM-Rezeptor entdeckt und analysiert [75]. Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur der Poly-Ig-Rezeptor (pIgR) und der Fcα/μR dafür bekannt, dass sie IgM, aber auch IgA-Antikörper binden können [76].

Der FcμR ist ein Sialoglykoprotein (Transmembranprotein Typ I) und besteht aus einer extrazellulären Region, mit einer V-Set Immunglobulin-ähnlichen Domäne (Ig-

Domäne), einem Transmembransegment und einer C-terminalen zytoplasmatischen Region (Abb. 8) [75]. Der Rezeptor weist keine N-Glykosylierungsstellen, aber O-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Region, außerhalb der Ig-Domäne, auf [75, 77]. Die Immunglobulin-ähnliche Domäne zeigt Homologien zu den bekannten  $\text{pIg}$ - und  $\text{Fc}\alpha/\mu$ - Rezeptoren, besitzt jedoch auch einige signifikante Aminosäureunterschiede, die die exklusive, spezifische  $\text{Fc}\mu$ -Bindung des  $\text{Fc}\mu\text{R}$  erklären könnten [75]. B- und T-Lymphozyten und im geringeren Umfang auch NK-Zellen exprimieren den humanen  $\text{Fc}\mu\text{R}$ . Dies ist ein wesentlicher Unterschied zwischen dem  $\text{Fc}\mu\text{R}$  und anderen  $\text{Fc}$ -Rezeptoren, die im Allgemeinen nicht durch T-Lymphozyten exprimiert werden [72, 75]. Das *FCMR* Gen, welches den  $\text{Fc}\mu\text{R}$  codiert, liegt auf dem Chromosom 1q32.2 in unmittelbarer Nachbarschaft zu den IgM-Rezeptoren  $\text{pIgR}$  und  $\text{Fc}\alpha/\mu\text{R}$  [61, 75]. Basierend auf einem lokalen Alignment auf cDNA-Ebene wurde eine Identität zwischen dem  $\text{Fc}\mu\text{R}$  und dem bereits beschriebenen Fas-apoptotischen inhibierenden Molekül 3 (FAIM3), auch TOSO genannt, identifiziert. Die Aufgabe des  $\text{Fc}\mu\text{R}$  im Immunsystem ist bisher nur unzureichend charakterisiert [70]. Die Funktion des  $\text{Fc}\mu\text{R}$  wurde ursprünglich aufgrund der inhibitorischen Wirkung bei Fas-vermittelter T-Zell-Apoptose als antiapoptotisch beschrieben [78]. Dies wird auf Grundlage neuester Erkenntnisse jedoch kontrovers diskutiert [75, 79, 80]. In Bezug auf B-Zellen trägt der  $\text{Fc}\mu\text{R}$  zu einer erhöhten B-Zellenantwort durch die Interaktion mit B-Zellenrezeptoren bei. Des Weiteren zählt die Antigenpräsentation zu den wichtigsten Funktionen des  $\text{Fc}\mu\text{R}$  auf B-Zellen [75].  $\text{Fc}\mu$ -Rezeptoren nehmen Einfluss auf die Differenzierung und Selbstregulation von B-Zellen und verhindern die Bildung von autoreaktiven B-Zellen [81]. Über die Funktion des  $\text{Fc}\mu\text{R}$  auf T-Zellen sind bisher nur wenige Theorien bekannt. Es wird angenommen, dass der Rezeptor mit B-Zellenrezeptoren oder auch gebundenen Immunkomplexen auf B-Zellen interagiert und so eine Interaktion von B- und T-Zellen ermöglicht. Ebenfalls wird ein Einfluss auf die IgM-abhängige zelluläre Zytotoxizität von T-Zellen für möglich gehalten [75].

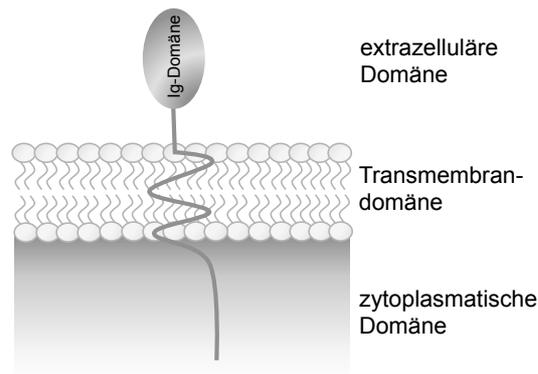


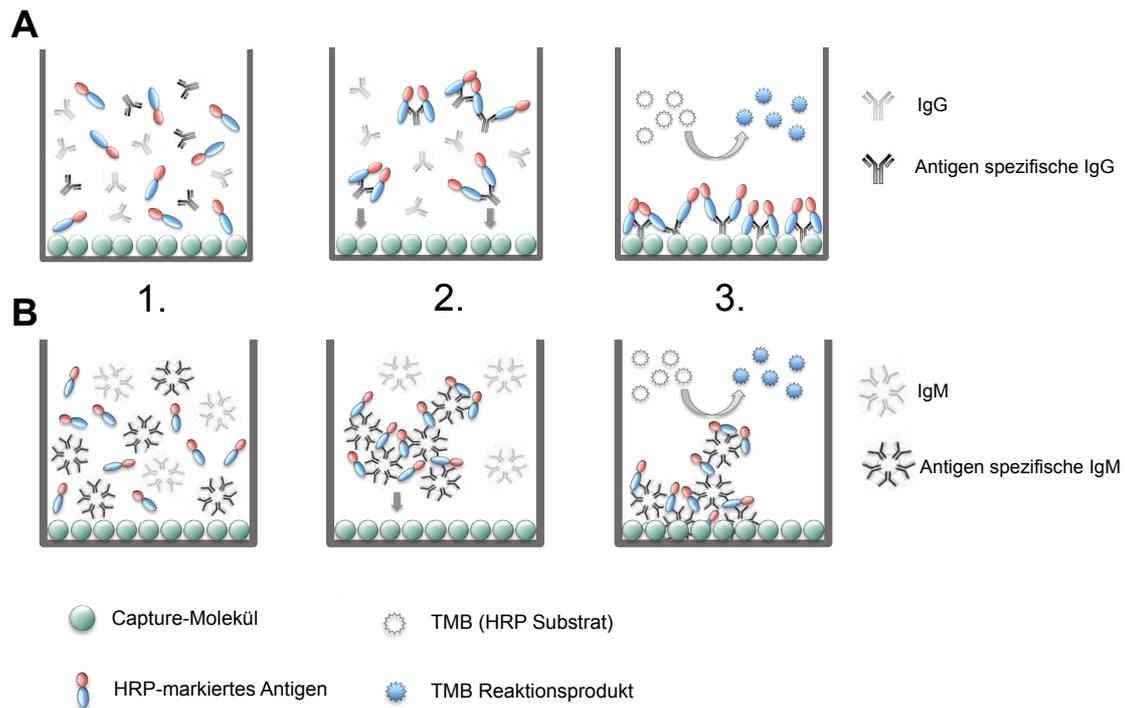
Abbildung nach [82]

**Abbildung 8: Putative Struktur des Fc $\mu$ R.** Der Fc $\mu$ -Rezeptor (60 kDa) für IgM-Ak besteht aus einer extrazellulären Domäne. In ihr enthalten ist eine V-Set Immunglobulin-ähnlichen Domäne (Ig-Domäne), die für die IgM-Immunkomplexbindung verantwortlich ist. Dann folgt eine Transmembrandomäne, die geladene Histidin-Reste aufweist und in eine C-terminale zytoplasmatische Domäne übergeht. Diese ist für einen Fc-Rezeptor auffällig lang und enthält 5 Serin- und 3 Tyrosinreste, wodurch sich der Fc $\mu$ R von den anderen IgM-Rezeptoren pIgR und Fc $\alpha/\mu$ R unterscheidet. [82-84]

### 1.2.3 Verwendung von Fc-Rezeptoren als Capture-Moleküle in ELISA-Systemen

Die Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig-Domänen) des Fc $\gamma$ RIIa sind für die Bindung der IgG-Immunkomplexe durch den Rezeptor verantwortlich. Diese Eigenschaft wurde 2011 in einem neu entwickelten Immunkomplex-ELISA (IC-ELISA) zur Detektion von Virusinfektionen ausgenutzt (Abb. 9A). Die rekombinant hergestellten Ig-Domänen wurden als Capture-Moleküle in dem ELISA eingesetzt. Nach der Bindung von spezifischen anti-WNV/anti-FSME IgG-Ak an ein HRP-markiertes Antigen (ED3-Domäne des Virus E-Proteins) konnten die gebildeten Immunkomplexe durch Ig-Domänen des Fc $\gamma$ RIIa gebunden und anschließend photometrisch nachgewiesen werden [85].

Mit dem IgG-IC-ELISA zur Detektion von Flavivirus-Infektionen konnte bereits gezeigt werden, dass dieses neue Testsystem sehr sensitiv und spezifisch ist. Durch die Verwendung des ED3-Antigens (Domäne des Virushüllproteins E) mit 5-6 virusspezifischen Epitopen ist eine hohe Spezifität möglich [85]. Des Weiteren ist die IC-ELISA Durchführung sehr einfach, es ist nur ein Inkubations- und Waschschrift nötig, wodurch die Möglichkeit des *high-throughput testing* besteht [86]. Eine hohe Verdünnung des HRP-markierten Antigens durch die enge Vernetzung von Antigen und HRP bewirkt den Einsatz von kompetitiven Antigenen, mit dem eine Unterdrückung von Kreuzreaktionen realisierbar ist [86].



**Abbildung 9: Prinzip des Immunkomplex-ELISA. (A) IgG-IC-ELISA. (B) IgM-IC-ELISA.**

1. Das zu untersuchende Patientenserum mit den virusspezifischen und unspezifischen Antikörpern und ein HRP-markiertes Antigen werden simultan auf einer Capture-Molekül-beschichteten Oberfläche inkubiert.
2. Während der Inkubation bilden sich Immunkomplexe aus virusspezifischen Antikörpern (A: IgG, B: IgM) und HRP-markierten Antigenen, die durch das Capture-Molekül gebunden werden. (A: His-FcγR-Ig, B: His-FcμR-Ig)
3. Nach dem Entfernen der ungebundenen Substanzen durch einen Waschschrift wird durch die Zugabe von TMB-Substrat eine enzymatische Reaktion mit dem HRP initialisiert. Nach Abstopfung der Reaktion mit Schwefelsäure kann der entstandene Farbumschlag photometrisch (450 nm) gemessen werden. [85, 87]

Die kommerziell erhältlichen, serologischen Testkits in der Virusdiagnostik basieren vorwiegend auf dem etablierten indirekten ELISA und für IgM-Immunoassays auf dem  $\mu$ -Capture ELISA [88-90] (Abb. 10). Beim indirekten ELISA (Abb. 10A) wird das Antigen auf der Platte immobilisiert. Auf den Antigen-beschichteten Platten wird dann zunächst das Serum inkubiert und die virusspezifischen Antikörper gebunden. Nach der Entfernung der restlichen Serumbestandteile durch einen Waschschrift wird anschließend ein Enzym-markierter Antikörper hinzupipettiert, der an die virusspezifischen Antikörper bindet. Nach einem erneuten Waschschrift wird ein Enzymsubstrat zur Entwicklung der enzymatischen Reaktion hinzugegeben. Die photometrische Auswertung der Reaktion erfolgt nach Abstopfung [91]. Eine Schwachstelle dieses ELISA-Systems stellt die Immobilisierung des Antigens dar. Dadurch besteht die Gefahr, dass das Antigen nicht ausreichend zugänglich ist oder strukturell verändert wurde.

Der  $\mu$ -Capture ELISA (Abb. 10B) wird auf anti-human IgM-Ak beschichteten Platten aufgebaut. Nach Zugabe der Serumprobe werden zunächst alle im Serum enthaltenen IgM-Ak an die Platte gebunden. Nach einem Waschschrift wird das virusspezifische Enzym-markierte Antigen hinzugegeben. Dieses bindet nur an virusspezifische IgM-Ak.

Nach einem erneuten Waschschrift wird die Entwicklung der Reaktion nach Zugabe des Enzymsubstrats initialisiert. Nach Abstopfung der enzymatischen Reaktion kann der ELISA photometrisch gemessen werden [91].

Dadurch, dass beim  $\mu$ -Capture ELISA im ersten Schritt alle IgM-Ak gebunden werden, kann dies zu einer verringerten Sensitivität führen, wenn viele unspezifische IgM-Ak (z.B. durch Autoimmunerkrankungen) im Serum enthalten sind. Ein Vorteil des  $\mu$ -Capture ELISA ist jedoch, dass ein hoher Anteil an spezifischen IgG-Ak nicht zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Eine hohe Konzentration von virusspezifischen IgG-Ak führt dazu, dass aufgrund der geringen Affinität der IgM-Ak diese weniger gebunden werden können [92]. Da beim  $\mu$ -Capture-ELISA durch die anti-human IgM-Ak Beschichtung nur IgM-Ak gebunden werden, haben IgG-Ak keinen Einfluss und müssen nicht wie z.B. beim indirekten ELISA zuvor entfernt werden.

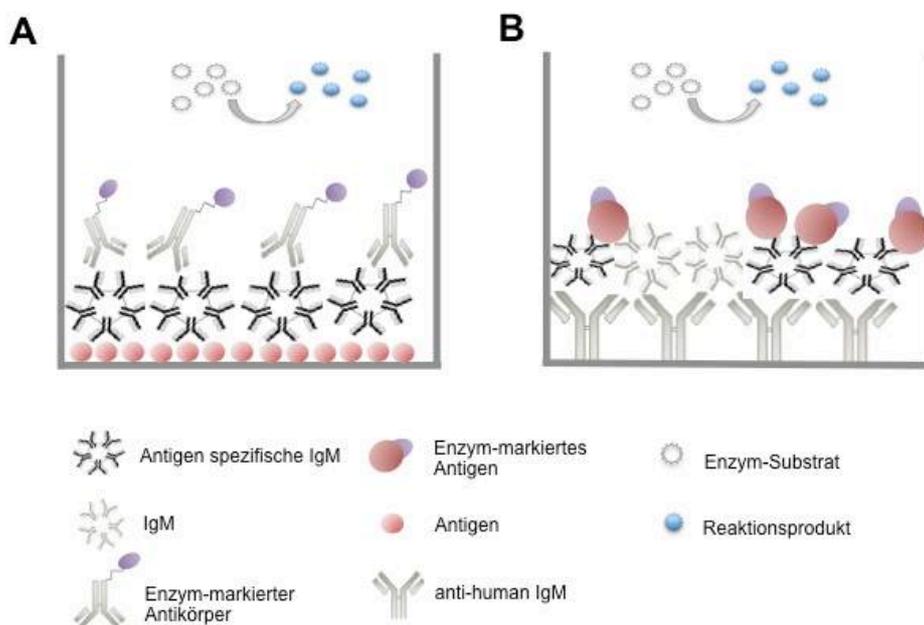


Abbildung nach [91]

**Abbildung 10: Prinzip der etablierten ELISA-Methoden: indirekter ELISA (A) und  $\mu$ -Capture-ELISA (B).**

**(A)** Beim indirekten ELISA ist das virusspezifische Antigen auf der Oberfläche einer Platte immobilisiert. Die im Serum enthaltenen spezifischen IgM-Ak binden an die Platte und können nach Inkubation mit einem Enzym-markierten Antikörper (z.B. HRP) photometrisch nachgewiesen werden.

**(B)** Beim  $\mu$ -Capture ELISA wird eine anti-human IgM beschichtete Platte verwendet. An diese binden alle im Serum enthaltenen IgM-Ak. Durch die folgende Inkubation mit einem virusspezifischen Enzym-markierten Antigen (oder z.B. umarkiertes Antigen+ anti-Antigen Antikörper/HRP) werden letztendlich nur die virusspezifischen IgM detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll auf Basis der Immunglobulin-ähnlichen Domänen des Fc $\mu$ R ein IgM-IC-ELISA (Abb. 9B) entwickelt und validiert werden. Die Vorteile des IgG-IC-ELISA sollten auf den IgM-IC-ELISA in gleicherweise zutreffen, wodurch der IgM-IC-ELISA als neue Plattformtechnologie in der Virusdiagnostik etabliert werden könnte.

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Erstes Ziel dieser Arbeit war die rekombinante Produktion der Immunglobulin-ähnlichen Domäne des Fc $\mu$ -Rezeptors in einer reproduzierbaren Form und in wirtschaftlich lohnenswerter Menge. Nach erfolgreicher Herstellung sollten die Bindungseigenschaften der Domäne genauer charakterisiert werden, um dadurch die Eignung als potenzielles Capture-Molekül für einen IgM Immunkomplex-ELISA festzustellen. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines IgM-Immunkomplex ELISA zur Detektion von Arbovirus-Infektionen. Die Testentwicklung sollte anhand von drei Vertretern dieser Virusgruppe durchgeführt werden. Hierzu gehören die Flaviviren WNV und ZIKV und das Nairovirus CCHFV. Zunächst sollten die Antigene für die Flaviviren rekombinant hergestellt und die Prozesse optimiert werden. Das CCHFV-Nukleoprotein als Antigen lag bereits in der Arbeitsgruppe vor.

Nach Entwicklung der ELISA-Protokolle zur Detektion von virusspezifischen IgM-Ak sollten die Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität getestet werden und ein Vergleich mit aktuellen, kommerziell erhältlichen serologischen Testkits erfolgen. Wenn die wesentlichen Kriterien eines guten in-vitro Tests erfüllt werden, sollten die entwickelten Tests zur Analyse größerer Serumpanelns akuter Ausbrüche (CCHFV: Kosovo 2013-2015, ZIKV: Brasilien 2015-2016) eingesetzt werden.

Die praktischen Arbeiten und die dazugehörigen Dokumentationen im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden, wie für die Entwicklung von In-vitro Diagnostika vorgeschrieben, unter Berücksichtigung der EN ISO 13485:2016 Norm durchgeführt. Dadurch wurden von Beginn an die Voraussetzungen im Bezug auf eine mögliche zukünftige Kommerzialisierung des IgM-Immunkomplex-ELISA erfüllt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Applichem
Agarose	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Bilirubin	Sigma-Aldrich
Bradford-Lösung	Applichem
Bromphenolblau	Merck/Millipore
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant Blau R 250	Merck
CutSmart Buffer (10x)	Biolabs
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific
Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O)	Roth
dNTP-Mix	Invitrogen
DTT (Dithiothreitol)	Biomol
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	Biomol
Essigsäure (100 %)	Roth
Ethanol (100 %, reinst, vergällt)	Roth
FKS ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )	PAA
Glukose	Sigma-Aldrich
Glutathione HiCap Matrix	Qiagen
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Roth
Harnstoff (Urea)	Roth
Hämoglobin	Sigma-Aldrich
5x HF Puffer	Biolabs
Imidazol	Roth
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid)	Peqlab
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
L-Arginin ( <i>reagent grade</i> )	Sigma-Aldrich
LB-Agar	Roth
Liquid Plate Sealer	Candor
LB-Medium	Roth
L-Glutathione reduziert (GSH)	Sigma-Aldrich
L-Glutathione oxidiert (GSSG)	Sigma-Aldrich
MES	Roth

Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Midori Green Advanced DNA Stain	Nippon Genetics Europe GmbH
Natriumacetat	Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Applichem
Natriumborhydrid	Roth
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumperiodat	Sigma-Aldrich
NiNTA Matrix	Qiagen
Nonidet P-40 (NP40)	Applichem
Nuklease-freies Wasser	Roth
PEG4000	Roth
Phenolrot	Sigma-Aldrich
PMSF	Applichem
Proclin 300	Sigma-Aldrich
3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate (NDSB-201)	Sigma-Aldrich
RF/IgG-Absorbent	IBL
Salzsäure (25 %)	Roth
Schwefelsäure (1 N)	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
TEMED (Tetramethylaminomethan)	Sigma-Aldrich
TMB (Sure Blue Reserve™ TMB Microwell Peroxidase Substrate)	KPL
Triglyceride	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Roth
Trockeneis	BNITM
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich

### 2.1.2 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acetatpuffer für HRP-Markierung	1 mM Natriumacetat pH 4,4
Beschichtungspuffer	1x PBS pH 7,4 0,01 % NaN <sub>3</sub> 0,01 % Phenolrot
Bilirubin	10 mg/ml in Chloroform
Bindepuffer pH 8,0	6 M Harnstoff 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 10 mM Tris-HCl 5 mM Imidazol 150 mM NaCl 1 % Glycerol

Bindepuffer 3C pH 7,2	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 mM NaCl
Blockierungspuffer (BP)	1x PBS pH 7,4 0,25 % BSA 0,05 % Tween 20
Blockierungspuffer 2 (BP2)	1x PBS pH 7,4 1 % BSA
Calciumchlorid	50 mM CaCl <sub>2</sub>
Calciumchlorid/Glycerin	50 mM CaCl <sub>2</sub> 50 % Glycerin
Carbonatpuffer (0,2 M) pH 9,5; Neutralisation der HRP	10 ml 1 M Carbonatpuffer pH 9,5 40 ml ddH <sub>2</sub> O
Carbonatpuffer (0,5 M) pH 9,5; pH-Einstellung bei HRP-Markierung	10 ml 1 M Carbonatpuffer pH 9,3 10 ml ddH <sub>2</sub> O
Carbonatpuffer (1 M) pH 9,3, pH 9,5	1 M NaHCO <sub>3</sub> 1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Coomassie Blau Färbelösung	0,25 % Coomassie Blau R250 25 % Methanol 10 % Essigsäure
Einfrierlösung	Konjugateverdünnungslösung 1:1 gemischt mit Glycerol
Elutionspuffer (Affinitätschromatografie) A pH 8,0	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM KCl 6 M Harnstoff 250 mM Imidazol
Elutionspuffer (Affinitätschromatografie) B1 pH 3,5	6 M Harnstoff 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2xH <sub>2</sub> O 10 mM Tris-HCl 5 mM Imidazol 150 mM NaCl 1 % Glycerol
Elutionspuffer (Affinitätschromatografie) B2 pH 8,0	6 M Harnstoff 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2x H <sub>2</sub> O 10 mM Tris-HCl 250 mM Imidazol 150 mM NaCl 1 % Glycerol
Entfärber SDS-PAGE	40 % Methanol 10 % Essigsäure
Gelfiltrationspuffer A pH 9,5	25 mM Carbonatpuffer 150 mM NaCl 10 % Glycerol
Gelfiltrationspuffer B pH 7,0	50 mM Phosphatpuffer 150 mM NaCl 10 % Glycerol
Gelfiltrationspuffer C pH 9,0	20 mM Phosphatpuffer 150 mM NaCl 10 % Glycerol 0,01 % NP40
Gelfiltrationspuffer D pH 9,0	25 mM Carbonatpuffer 150 mM NaCl 10 % Glycerol

Glycerolstocklösung 50 %	50 % Glycerol 50 % 2x LB-Medium
Hämoglobin	20 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Konjugatverdünnungslösung (CDB)	1x PBS pH 7,4 1 % BSA 0,5 % FKS 1 % NP40 0,1 % Proclin 300 → für ZIKV-IgM-IC-ELISA mit 2 % final PEG4000
4x Lämmli-Ladepuffer (reduziert)	1 ml 500 mM Tris pH 6,8 1,56 ml 10 % SDS 0,04 ml 1 % Bromphenolblau 1,6 ml Glycerol 0,32 ml 1 M DTT 3,12 ml ddH <sub>2</sub> O
4x Lämmli-Ladepuffer (nativ)	1 ml 500 mM Tris pH 6,8 1,56 ml 10 % SDS 0,04 ml 1 % Bromphenolblau 1,6 ml Glycerol 3,44 ml ddH <sub>2</sub> O
LB-Medium (1x)	20 g LB-Medium in 1 l ddH <sub>2</sub> O
LB-Medium (2x)	40 g LB-Medium in 1 l ddH <sub>2</sub> O
Lösung 1 (Plasmidpräparation)	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA
Lösung 2 (Plasmidpräparation)	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung 3 (Plasmidpräparation)	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure
Markierungspuffer B pH 9,0	50 mM Phosphatpuffer 150 mM NaCl 20 % Glycerol
MES, pH 7,0	10 mM MES in ddH <sub>2</sub> O
PBS-Stock (10x) pH 7,4	1,5 M NaCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O
PBS (1x)/ 0,05 % TritonX-100	0,15 M NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O 0,05 % TritonX-100
Puffer 3C pH 7,4	1x PBS pH 7,4 20 % Glycerol
Rückfaltungspuffer A pH 9,5	0,1 M Tris-HCl 0,3 M L-Arginin 150 mM NaCl 5 mM GSH (red) 0,5 mM GSSG (ox) 0,1 mM PMSF 0,01 % NaN <sub>3</sub>
Rückfaltungspuffer B pH 8,5	0,1 M Tris-HCl 0,3 M L-Arginin 150 mM NaCl 0,1 mM PMSF 0,01 % NaN <sub>3</sub>

Rückfaltungspuffer C pH 8,5	0,1 M Tris-HCl 400 mM NDSB-201 5 mM GSH 0,5 mM GSSG
Rückfaltungspuffer D pH 8,8	0,1 M Tris-HCl 400 mM NDSB-201 5 mM GSH 0,5 mM GSSG 0,1 mM PMSF 1 mM EDTA
Sammelgelpuffer (4x Gelpuffer) SDS-PAGE	0,5 M Tris-Base pH 6,8 0,4 % SDS
SDS-Laufpuffer 10x	0,25 M Tris-Base 2 M Glycin 1 % SDS
Serumverdünnungslösung (SDB)	1x PBS pH 7,4 0,05 % Proclin 300 0,01 % Phenolrot
Solubilisierungspuffer pH 7,8/8,8	6 M Guanidinhydrochlorid 50 mM Tris-HCl
TAE-Puffer (1x) pH 8,3	2 mM Tris-Base 0,05 mM EDTA
TE-RNase Puffer	2 ml TE-Puffer pH 8,0 4 µl RNase (10 mg/ml)
Trenngelpuffer SDS-PAGE	1,5 M Tris-Base pH 8,8 0,4 % SDS
Triglyceride	100 mg/ml in Chloroform
Verdünnungslösung für Bradford-Test	0,45 g NaCl in 50 ml ddH <sub>2</sub> O
Waschpuffer (Ni-Affinitätschromatographie) A pH 8,0	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM KCl 6 M Harnstoff 10 mM Imidazol
Waschpuffer (Ni-Affinitätschromatographie) B pH 6,3	6 M Harnstoff 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2xH <sub>2</sub> O 10 mM Tris-HCl 5 mM Imidazol 150 mM NaCl 1 % Glycerol
Waschpuffer C pH 7,4 (Stabilisierung His-FcyR-Ig- Platten)	100 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl
Waschpuffer E für ELISA pH 7,4	100 mM Tris-Base 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 0,005 % Proclin 300

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Detail	Hersteller
Acetatfolie für Mikrotiterplatten		Sarstedt
Aluminiumfolie		Roth
Aluverbundfolie	A20T, 13x16,5 cm	Long Life for Art
Antikondensationsbeutel		Long Life for Art
Einmalküvetten	10x4x45 mm	Sarstedt
Einmal-Wägeschalen	89x89x25 mm	Roth

ELISA-Streifenhalter		Thermo Scientific, Nunc
ELISA-Streifen	F8 Maxisorp Loose Nunc-Immuno Module aus Polystyren	Thermo Scientific, Nunc
Falcon-Röhrchen	15 ml/50 ml	Sarstedt
Filter (Steritop-GV; Steritop GP)	0,22 µm,	Millipore
Konzentratoren	Amicon®-Ultra-0,5 (3K,10K), Amicon®-Ultra-4 (3K,10K) Amicon® Ultra-15 (3K,10K)	Millipore
Kunststoffpipetten	5 ml/10 ml/25 ml	Sarstedt
Parafilm	Parafilm „M“	BEMIS
PCR-Reaktionsgefäße	0,2 ml	Sarstedt
Pellicon 3 Kassetten	NMWL 3 kDa	Millipore
Petrischalen	92x16 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner bio-one, Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Röhrchen für Übernachtskulturen	13 ml	Sarstedt
Säulen für Matrix	PD-10	GE Healthcare
Säulen für die Gelfiltration	HiLoad 16/600 Super- dex® 75, Super-dex® 75 10/300 GL	GE Healthcare
Transferpipetten	3,5 ml	Sarstedt
Wellplatte	96 Wells	Thermo Scientific
Zeba Spin Desalting Columns	Pierce 2 ml, 5 ml, 10 ml	Thermo Scientific
Zellkulturschalen	96 Well	Thermo Scientific
Zentrifugenbehälter	50 ml, 500 ml	Beckmann

### 2.1.4 Geräte

Bezeichnung	Detail	Hersteller
Agarosegelkammer	40-0708 40-1214	Peqlab
Äkta™ Purifier System	SN: 1657811	GE Healthcare
Bunsenbrenner	Labogaz 206	Roth
Brutschrank	IG 150	Jouan
Eismaschine		Manitowoc
Evos XL	100x	VWR
Förderpumpe	Ecoline	Ismatec
Geräte SDS-PAGE	Consort EV 265, Power- Pack	BioRad
Geltrocknungsrahmen	14x14 cm	Roth
Homogenisator	Potter S	Braun
Lock&Lock Boxen		OttoOffice
LVis-Platte (Low Volume)		BMG Labtech
Magnetrührer	RCT basic; RH digital	IKA
Makrokonzentratoren	Pellicon	Millipore

Mikrowelle	Micromat	AEG
Microplate Washer	alle durchgeführten Waschritte innerhalb der ELISA-Teste	Thermo Scientific
Multichannelpipette	TransferpetteS 10-100 µl, 30-300 µl	Brand
pH-Elektrode	Blue Line 14 pH Blue Line 16 pH	SI Analytics
pH-Meter	Lab 850	Geyer
Photometer (Nanodrop)	SPECTROstar <sup>Nano</sup>	BMG Labtech
Pipetten	Research Plus (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy	INTRA
Schüttelinkubator	Excella E25 R Innova 2000 RS TR05	New Brunswick Scientific
SDS-Gelkammer		BioRad
Sterilbank	Microflow <i>biological safety carbinet</i>	Nalge Nunc International
Thermoblock	Thermomixer comfort Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermozykler	Primus 25	Peqlab
Transferzelle, Elektrophorese		BioRad
Ultraschall Homogenisator	Bandelin SONOPLUS	Geyer
Vakuummaschine	C200	Multivac
Vortexer	VV3	VWR
Waage	Quintix224-1S, Analysenwaage TP 3002, Laborwaage Denver	Sartorius Denver Instruments
Wasserbad		GFL
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21 Centrifuge 5415C Heraeus Megafuge 16R Avanti J-26-XP	Thermo Scientific Eppendorf Thermo Scientific Beckman Coulter

### 2.1.5 Kits

ELISA-Kits	Hersteller
Anti-Zika Virus ELISA (IgM/IgG)	Euroimmun AG
VectoCrimea-CHF-IgG/IgM	Vector Best
West Nile Virus IgM Capture DxSelect <sup>TM</sup>	Focus Diagnostics

Molekularbiologische Kits	Hersteller
In-Fusion® HD Cloning Kit	Clontech
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid (Miniprep)	Macherey-Nagel
pGEM®-T-Easy Vector System I	Promega
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific

<b>Proteinbiochemische Kits</b>	<b>Hersteller</b>
Coomassie Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Latex Conjugation Kit (Blue Latex)	Innova Biosciences
RFslide	analyticon

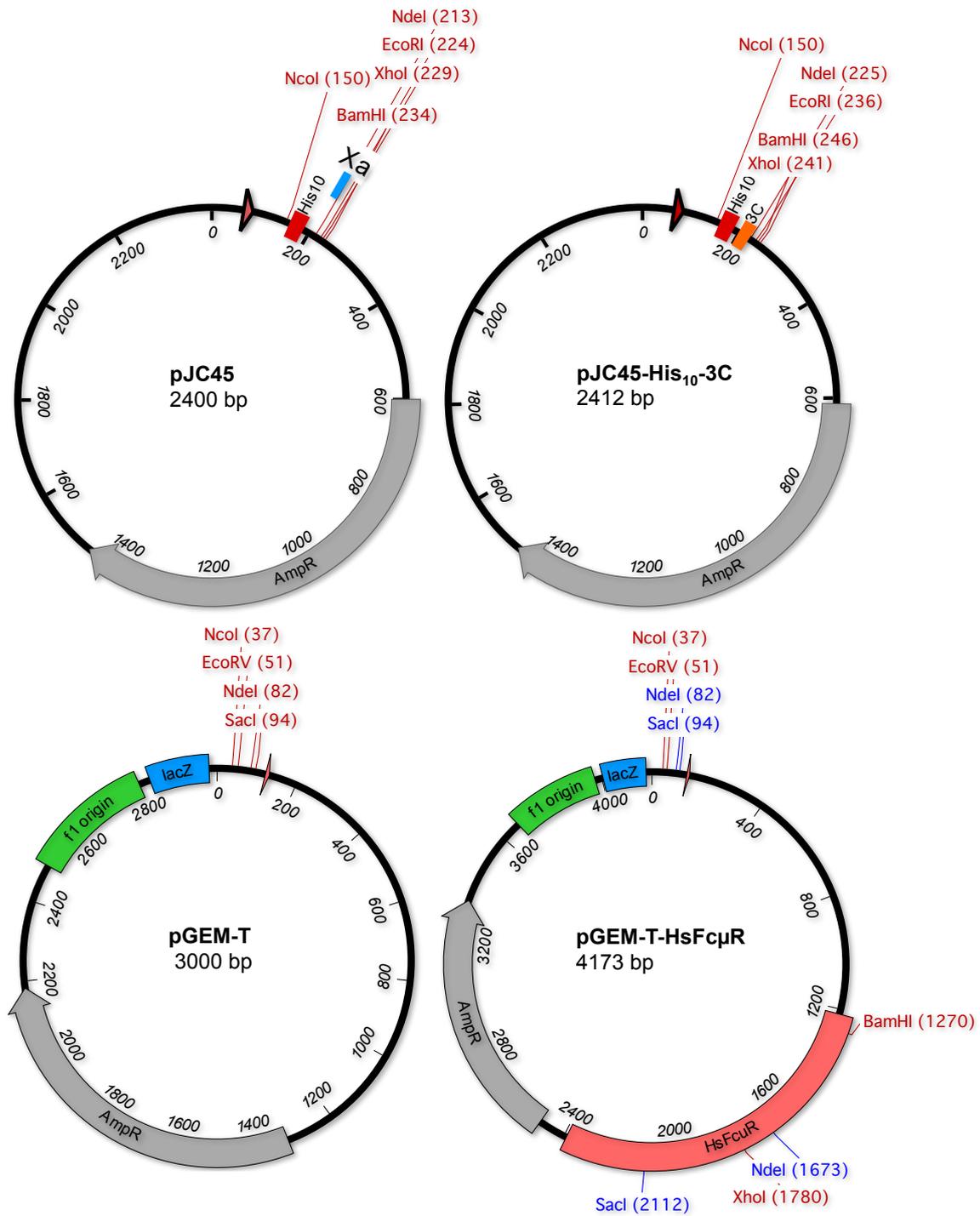
### 2.1.6 Marker

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Generuler 100 bp	NEB
Quick Load® 1kb DNA Ladder	BioLabs
PageRuler prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

### 2.1.7 Bakterienzellen

<b>Zellen</b>	<b>Selektionsmarker/Antibiotikaresistenz</b>	<b>Herkunft/Hersteller</b>
<i>DH5α E. coli</i>	Ampicillin (final 100 µg/ml)	Invitrogen #18265017
<i>pAPlacI BL21 E. coli</i>	Ampicillin (final 100 µg/ml) Kanamycin (final 50 µg/ml)	DDL, BNI Hamburg

## 2.1.8 Plasmide und Vektoren



### 2.1.9 Antikörper

Antikörper	Herkunftsorganismus	Hersteller
anti-human-IgM	Ziege	KPL
anti-human IgM/HRP	Ziege	Sigma-Aldrich
IgM isotype control	Mensch	Acris Antibodies
anti-Maus IgG (H+L)/HRP	Ziege	Thermo Scientific
anti-Polyhistidin; HIS-1	Maus	Sigma-Aldrich
anti-Rind IgG (H+L)/HRP	Ziege	Thermo Scientific
anti-Rind IgM/HRP	Schaf	Thermo Scientific

### 2.1.10 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase	Applichem
DNA Polymerase Phusion® HF	Biolabs
GoTaq G2 DNA Polymerase	Promega
Lysozym	Applichem
Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma-Aldrich
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Thermo Fisher)

Restriktionsendonuklease	Hersteller
<i>Bam</i> HI-HF	Biolabs
<i>Eco</i> RI-HF	Biolabs
<i>Nco</i> I-HF	Biolabs
<i>Sma</i> I	Biolabs

### 2.1.11 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide stammten von der Firma MWG Eurofins.

cDNA cod. für Protein	Bezeichnung	Sequenz
<b>His-Fc<math>\mu</math>R-Ig</b>	<b>#119</b> Fc $\mu$ R-IF-F	5'-CTCTTTCAGGGACCCGGGAGGATCCTCCAGAAGTAAAGGTAG-3'
	<b>#120</b> Fc $\mu$ R-IF-R1	5'-AGTTAGCTAGGGCCCGGGTCAACTGGGACATTCAGG3'
<b>WNV-ED3</b>	<b>#30</b> WN-EDIII-F-EcoR	5'-ATGAATTCGTTGAAGGGAACAACCTATGGC-3'
	<b>#31</b> WN-EDIII-R-XhoI	5'-ATCTCGAGAGACTTGTGCCAATGGTGATTG-3'
	<b>#38</b> WN-EDIII-F2-EcoR	5'-ATGAATTCCTGAAGGGAACAACCTATGGC-3'
	<b>#39</b> WN-EDIII-R-BamHI	5'-ATGGATCCTCAAGACTTGTGCCAATGGTGATTG-3'
<b>WNV-EP</b>	<b>#124</b> WNV-EPoT-if-F	5'-AGGAGATATACCATGGGCTTCAACTGCCTTGGATAGCAAC-3'
	<b>#125</b> WNV-EPoT-if-R	5'-CTAGGGCCCGGGATCCTCAAGACTTGTGCCAATGGTGATTG-3'
<b>ZIKV-NS1</b>	<b>#134</b> ZV-NS1_F	5'-TGGTTCTCACAGATCCTCATAGGC-3'
	<b>#135</b> ZV-NS1_R	5'-CCAGTGTTCAATTTCTGCGAAAGTAGC-3'
	<b>#142</b> ZV-NS1oT_if_F	5'-AGGAGATATACCATGGGCGACGTGGGGTGC TCAGTGGAC-3'
	<b>#141</b> ZV-NS1_if_R	5'-CTAGGGCCCGGGATCCTCACGCTGTCA CCATTGACCTACTAAG-3'
<b>Sequenzierungsprimer</b>	<b>#9</b> T7 promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
	<b>#52</b> T7 terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

### 2.1.12 Programme und Datenbanken

Bezeichnung	Art der Verwendung
Adobe Photoshop CS3	Zur Geldokumentation und Bearbeitung
Endnote X7	Literaturverwaltungsprogramm
Graph Pad Prism	Zur Erstellung der Grafiken
Lucidchart	Zur Erstellung der Fließdiagramme
MacVector 12.7	Sequenzanalysen

MedCalc Statistical Software, Vers. 17	Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse
NCBI, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Literaturrecherche
SPECTROstar <sup>Nano</sup> (Mars) Software	OD-Messungen für Bradford-Test und ELISA-Auswertungen [BMG Labtech]
Swiss-Model, <a href="http://www.expasy.org">www.expasy.org</a>	Erstellung eines Strukturmodells

### 2.1.13 Seren

Eine detaillierte Übersicht zu den virusspezifischen IgM positiven Seren befindet sich im Anhang.

Infektion	Herkunft	Beschreibung	Zur Verfügung gestellt von
-	Europa, Asien, Süd Amerika 2012-2016	84 negative Blutspenderseren	Dr. Simone Kann [BNITM], Dr. Jörg Blessmann [BNITM]
CCHFV	Europa (Kosovo) 2013-2014	59 humane anti-CCHFV IgM positive Patientenseren (15 Patienten mit Verlaufspuben) [IgM/IgG IFT, PCR-bestätigt]	Dr. Petra Emmerich [BNITM] Prof. Salih Ahmeti [Universität Hasan Prishtina]
	Afrika (Kamerun) 2012-2014	4 Zebuseren, Probenabnahme über 4 Jahre (Verlaufspuben), [IgM/IgG CHF Vector Best ELISA]	Dr. Norbert Brattig [BNITM] Nancy Ngwasiri
DENV	Europa	8 DENV Seren von infizierten Reisrückkehrern, [IgM/ IgG IFT]	Prof. Herbert Schmitz [BNITM] Dr. Petra Emmerich
	Süd Amerika	31 humane Serumproben (Primär- und Sekundärinfektion), [PCR-bestätigt]	Dr. Simone Kann, Dr. Ana Maria Bispo de Filippis [Fiocruz Institut, Rio de Janeiro]
	Asien 2013-2014	8 humane Serumproben (Primär- und Sekundärinfektion), [PCR-bestätigt]	Dr. Jörg Blessmann
JEV	Asien	8 JEV infizierte/geimpfte humane Serumproben [JE Detect ELISA (InBios)]	Dr. Jörg Blessmann, DDL [BNITM]
FUO	Süd Amerika, Asien 2013-2014	12 humane Serumproben mit Fieber unbekannter Herkunft [FTD Tropical fever core Kit ( <i>fast-track</i> -Diagnostik)]	Dr. Simone Kann, Dr. Jörg Blessmann
Malaria	Afrika	34 Patientenseren mit akuter Infektion (23 <i>P. falciparum</i> , 11 <i>P. malariae</i> ) [IgG/IgM IFT]	Diagnostik Abteilung [BNITM]
MeV	Süd Amerika	6 Patientenseren mit MeV-Infektion	Dr. Ana Maria Bispo de Filippis
RUBV	Süd Amerika	6 Patientenseren mit RUBV-Infektion	Dr. Ana Maria Bispo de Filippis
TBEV	Europa	2 TBEV infizierte/geimpfte Patientenseren	Biomex, Heidelberg

<b>WNV</b>	Kanada	20 humane anti-WNV IgM/IgG positive Patientenproben, [PRNT bestätigt, IgM/IgG DxSelect ELISA (Focus Kit)]	Prof. Mark Loeb Pardeep Singh [McMaster Universität]
<b>YFV</b>	Europa 2014	18 YFV geimpfte humane Serumproben [IgG/IgM IFT]	RKI
	Süd Amerika	22 geimpfte humane Serumproben	Dr. Ana Maria Bispo de Filippis, Dr. Simone Kann
<b>ZIKV</b>	Brasilien 2015	56 humane anti-ZIKV IgM/IgG positive Patientenproben (28 Patienten, je eine frühe (0-4 d nach ersten Symptomen) und eine späte (ab 5 d nach ersten Symptomen) Probe) [PCR bestätigt]	Dr. Ana Maria Bispo de Filippis

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe der *SuperScript® II Reverse Transkriptase* (Invitrogen) über Random Priming nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein Reaktionsansatz beinhaltete 250 ng RNA in einem 20 µl Reaktionsvolumen. Das Umschreiben der viralen RNA in cDNA erfolgte mit finaler Zugabe von 200 Unit der *SuperScript® II Reverse Transkriptase* (MMLV Reverse Transkriptase). Die cDNA diente als Template bei der Amplifikation der DNA-Sequenzen mittels PCR (2.2.1.2).

#### 2.2.1.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Sequenzen der rekombinanten Antigene und die Immunglobulin-ähnlichen Domäne des Fcγ-Rezeptors mittels *Phusion® HF DNA Polymerase* (BioLabs) amplifiziert. Die Synthetisierung der verwendeten Primer erfolgte durch die Firma MWG Eurofins (2.1.11). Ein Reaktionsansatz durchlief 30 PCR-Zyklen, anschließend wurde das Amplifikat analysiert (2.2.1.4). Der PCR-Reaktionsansatz enthielt die in der Tabelle 1 angegebenen Komponenten.

Tabelle 1: Reaktionsansatz für PCR.

<b>Reaktionsansatz (50 µl)</b>	
5x HF-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Template (10 ng/µl)	1 µl
Forward-Primer (10 µM)	2,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	2,5 µl
<i>Phusion® Polymerase</i> (2,000 U/ml)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	32,5 µl

Mit Hilfe des Thermozyklers wurde das in Tabelle 2 dargestellte Programm für jeden Reaktionsansatz durchgeführt. Die Dauer der DNA-Synthese (72 °C) war abhängig von der zu synthetisierenden DNA-Fragmentgröße.

Tabelle 2: PCR-Programm.

Programm	
98 °C	Hotstart
98 °C	30 s
98 °C	10 s
50 °C	30 s
72 °C	45 s-1,5 min 30 Zyklen
72 °C	5 min
8 °C	bis zur Weiterverarbeitung

### 2.2.1.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau ermöglicht durch die Verwendung von Restriktionsendonukleasen das Schneiden von DNA-Molekülen an spezifischen Schnittstellen. Diese Methode diente zum einen der Klonierungsvorbereitung von Vektoren/ DNA-Fragmente und zum anderen um im Anschluss hergestellte Plasmide auf ihre Richtigkeit überprüfen zu können. Der Reaktionsansatz kann aus der folgenden Tabelle 3 entnommen werden. Die Reaktionsinkubation betrug 1 h. Die Temperatur während der Inkubation richtete sich nach dem Temperaturoptimum der Restriktionsendonukleasen (25 °C-37 °C) und wurde im Thermoblock eingestellt. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz auf Eis gelagert.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau.

Restriktionsansatz (20 µl)	
DNA-Fragment/Vektor	1 µg
Cut-Smart Puffer (10 x)	2 µl
Restriktionsendonuklease (20 U/µl)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	bis zum Erreichen von 20 µl

### 2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Amplifizierte und/oder verdaute DNA-Fragmente wurden in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (BioRad) der Größe nach aufgetrennt. 1 %-ige und 1,5 %-ige Agarosegele fanden hierbei Verwendung, in denen 0,3-3,0 kb große Nukleinsäure-Stränge mit bekannten Größenstandards (*Generuler 100 bp*, NEB; *Quick Load® 1 kb DNA Ladder*, Thermo Scientific) verglichen wurden. 1x TAE-Puffer diente als Lauf- und Gelpuffer, zur Gelherstellung wurde Agarose in dem Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen des Gelpufferansatzes erfolgte die Zugabe von 2 µl des Farbstoffes *Midori Green Ad-*

vance (Nippon Genetics Europe GmbH). Der Gelansatz mit hinzugefügtem Probenkamm erhärtet dann abschließend im Gelschlitten und konnte mit Proben beladen werden. Die DNA-Proben wurden mit *6x DNA Loading Dye* (ein Fünftel ihres Gesamtvolumens, Thermo Scientific) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V für 45 min<sup>-1</sup> h.

#### **2.2.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Aufreinigung**

Nach dem Restriktionsverdau (2.2.1.3) wurden die verdauten Vektoren/DNA-Fragmente in einem 1 %-igem Agarosegel aufgetrennt (2.2.1.4). Anschließend erfolgte das Ausschneiden der aufgetrennten DNA-Banden aus dem Gel und die Aufreinigung mit Hilfe des Kits *PCR clean-up Gel extraction* (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben. Die durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente (2.2.1.2) wurden mit dem Kit gemäß Herstellerangaben gereinigt. Die DNA-Elution erfolgte in beiden Protokollen mit 20 µl NE-Puffer.

#### **2.2.1.6 Photometrische Konzentrations-und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrations-und Reinheitsbestimmung von DNA- und RNA-Proben wurde mit Hilfe des SpectroStar<sup>Nano</sup> (BMG, Labtech) durchgeführt. Das Gerät bestimmt zu diesem Zweck die Absorption bei 260 nm und 280 nm. Für eine Messung wurden jeweils 1-2 µl der Probe auf eine LVis-Platte aufgetragen und die Absorption bei 260 nm (Nukleinsäurebereich) und 280 nm (Proteinbereich) ermittelt. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht bei doppelsträngiger DNA etwa 50 µg/ml. Der Quotient aus 260 nm/280 nm ermöglicht eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäureprobe und sollte zwischen 1,8 bis 2,0 liegen.

#### **2.2.1.7 Klonierung**

Die Klonierung ist in der Molekularbiologie eine Methode zur Herstellung und Vervielfältigung von DNA. Im Rahmen dieser Arbeit fanden drei unterschiedliche Klonierungswege zur Herstellung der Expressionsvektoren Anwendung [93].

##### **2.2.1.7.1 In-Fusion® Klonierung**

Die Methode der In-Fusion® Klonierung wurde zur Herstellung der Expressionsvektoren für die Proteine ZIKV-NS1, WNV-EP und His-FcµR-Ig verwendet. Die Bildung von homologen Bereichen zwischen Insert und Vektor ermöglichte eine Integration des Inserts in den zuvor linearisierten Vektor (2.2.1.3). Die Klonierung wurde mittels *In-Fusion® HD Cloning Kit* (Clontech) durchgeführt.

#### 2.2.1.7.2 Klassische Klonierung

Die Klassische Klonierung besteht aus einer Kombination von Restriktionsverdau und Ligation des PCR-Produkts/Inserts und Vektors.

Beginnend mit dem Restriktionsverdau (2.2.1.3) erfolgte im Anschluss die Ligation des Inserts in den linearisierten Vektor durch das *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Scientific). Die Ligation wurde nach den Angaben im Kit durchgeführt. Mit Hilfe der Klassischen Klonierung wurde der Expressionsvektor für das rekombinante WNV-ED3 Protein hergestellt.

#### 2.2.1.7.3 TA-Klonierung

Die Klonierung einer amplifizierten DNA-Sequenz in den *pGEM*-Vektor wurde mit dem *pGEM®-T-Easy Vector System I Kit* (Promega) durchgeführt. Die Integration der DNA-Sequenz in den Vektor bedingte einen Poly-(A)-Schwanz am 3'-Ende, dieser wurde durch die *GoTaq G2 DNA Polymerase* (Promega) angehängt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes für das *A-tailing* (Tab. 4) dauerte 30 min (72 °C).

Tabelle 4: Reaktionsansatz für das *A-tailing* der DNA-Sequenz.

Reaktionsansatz (30 µl)	
PCR-Produkt/DNA-Sequenz	15 µl
5x Taq-Polymerase Puffer	6 µl
dATP [0,2 mM]	6 µl
<i>GoTaq Polymerase</i>	3 µl

Die Aufreinigung der modifizierte DNA-Sequenz erfolgte mit dem *PCR clean-up Gel extraction Kit* (Machery-Nagel).

Die Klonierung in den *pGEM®-T-Easy* Vektor wurde als Zwischenschritt bei der Herstellung des Expressionsvektoren für die Proteine ZIKV-NS1 und WNV-ED3 verwendet. Dieser zusätzliche Schritt diente zur Überprüfung der DNA-Sequenz, bevor die Klonierung in den Expressionsvektor durchgeführt wurde.

#### 2.2.1.8 Herstellung chemokompetenter *E.coli* Zellen

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurden die *E.coli* Zellen mit Calciumchloridlösungen behandelt. Nach Ausplattierung der kompetenten Zellen auf einer Agarplatte mit Antibiotika (2.1.7) und einer Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten die Zellen in Kolonien wachsen. Darauf folgend wurde eine Vorkultur, bestehend aus LB-Medium/Antibiotika mit einer Kolonie, angeimpft und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Überimpfung in 200 ml LB-Medium/ Antibiotika, diese wurde bis zu einer OD600 von 0,6-0,8 angezogen. Nach Zentrifugation (15 min, 2800 g) wurde das Zellpellet in 20 ml Calciumchloridlösung resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Es folgte eine Resuspension des Zellpellets in 2 ml kalter Calciumchlorid/Glycerin-Lösung. In flüssi-

gem Stickstoff wurde die Zellsuspension schockgefroren und in 50 µl Aliquotes abgefüllt. Bis zum Einsatz der kompetenten Zellen lagerten diese bei -80 °C.

#### **2.2.1.9 Transformation von DNA in chemokompetente *E.coli* Zellen**

Das Einbringen der DNA in die chemokompetenten Bakterienzellen erfolgte mittels Hitzeschocktransformation. Hierfür wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 0,2-1,0 µg Plasmid-DNA versetzt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes dauerte 30 min auf Eis. Der anschließend folgende Hitzeschock für 30 s bei 42 °C führte zur Aufnahme der DNA in die kompetenten Zellen. 950 µl warmes LB-Medium wurde zum Ansatz hinzugegeben und dieser für 1 h im Thermoschüttler (300 rpm, 37 °C) inkubiert. Danach folgte eine Ausplattierung von 200 µl des Zellansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmarkern (2.1.7). Die restlichen 800 µl der Zellsuspension wurden für 2 min bei 4000 g zentrifugiert, der Überstand bis auf 50 µl abgenommen und das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die 37 °C-Inkubation der angeimpften Agarplatten dauerte 12 h. Nach der ersten Inkubation wurde eine Kolonie von der Agarplatte gepickt und in eine 3 ml LB-Medium/Antibiotikum überimpft. Die Inkubation der Übernachtskultur dauerte weitere 12 h.

#### **2.2.1.10 Plasmidpräparation**

Um Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen zu isolieren, wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Hierfür erfolgte zunächst eine Zentrifugation (30 s, 11000 g) der Übernachtskultur (2.2.1.8) und das entstandene Pellet wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 (Inkubation 3 min auf Eis) und 150 µl Lösung 3 (Inkubation 5 min auf Eis) hinzupipettiert. Eine erneute Zentrifugation (10 min, 14200 g) ermöglichte die Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen. Der Überstand wurde verworfen und dem Zellpellet 1 ml 100 % Ethanol hinzugegeben. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz erneut zentrifugiert. Es folgte, nach erneuter Entfernung des Überstandes, die Zugabe von 96 % Ethanol und ein weiterer Zentrifugationsschritt. Vor Inkubation des Pellets in 50 µl TE-RNase-Puffer wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei 37 °C für 10 min getrocknet. Die 37 °C-Inkubation im TE-RNase Puffer dauerte 30 min. Abschließend wurde die isolierte DNA bei -20 °C eingefroren.

#### **2.2.1.11 DNA-Sequenzierung**

Die Firma SeqLab GmbH führte die DNA-Sequenzierung durch. Hierfür wurde ein 15 µl Reaktionsansatz bestehend aus 700-1200 ng Plasmid-DNA, 3 µl Primer und Nuklease-freiem Wasser eingeschickt. Die Analyse der Sequenzierungsdatei erfolgte mit dem *MacVector* Programm.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

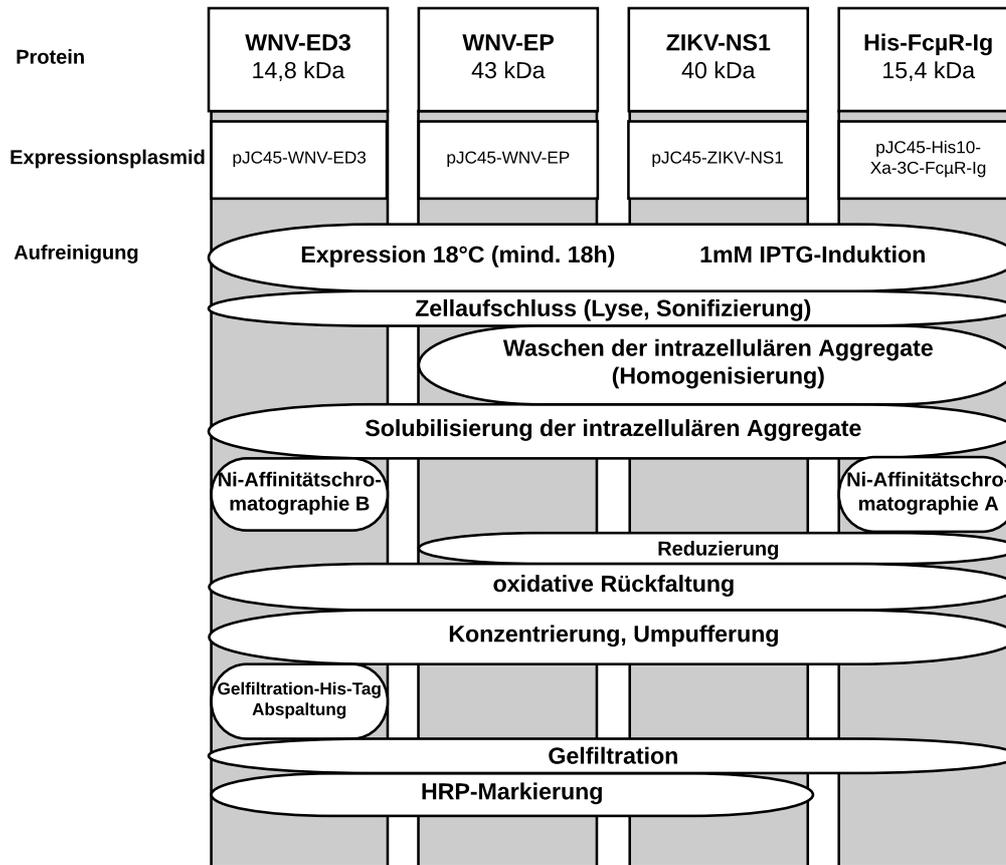


Abbildung 11: Fließdiagramm über die Abfolge der verwendeten proteinbiochemischen Methoden bei der Herstellung der Proteine WNV-ED3, WNV-EP, ZIKV-NS1 und His-Fc $\mu$ R-Ig.

### 2.2.2.1 Expression rekombinanter Proteine

Zu Beginn der Expression wurden 3 ml LB-Medium/Amp/ Kana- Vorkulturen (zusätzlich 1 % Glukose bei der Herstellung der Proteine ZIKV-NS1 und His-Fc $\mu$ R-Ig) mit einem Klon der Transformation (2.2.1.9) oder mit 25-50  $\mu$ l einer Dauerkultur (2.2.2.2) angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (180 rpm) wurde mit je 1/10 der Vorkultur in eine Hauptkultur (400-800 ml LB-Medium/Amp/Kana, optional 1 % Glukose) überimpft und diese bei 37 °C bis zu einer OD600 von 0,5-0,6 im Schüttelinkubator (150 rpm) weiterkultiviert. Die Zugabe von Glukose verhindert eine Vorexpression des rekombinanten Proteins, wodurch ein Hochwachsen der Bakterien vor Induktion behindert werden kann [94]. Bei Erreichen der OD600 von 0,5-0,6 wurde mit der Zugabe von IPTG (finale Konzentration 1 mM) die Expression induziert. Die Zellernte der Kulturen erfolgte nach einer weiteren Kultivierung bei 18 °C für mindestens 18 h durch einen Zentrifugationsschritt (4000 rpm, 15 min, 4 °C). Die entstandenen Zellpellets wurden in 8 ml 1x PBS pH 7,4 resuspendiert und bis zur Proteinisierung (2.2.2.3) bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle der Expression dienten entnommene

Zellproben vor und nach der Induktion. Die Analyse dieser Proben erfolgte mittels SDS-PAGE (2.2.2.12).

#### **2.2.2.2 Herstellung von Dauerkulturen**

Zur Verkürzung des Arbeitsaufwandes wurden nach Transformation der Expressionsvektoren Dauerkulturen von den transformierten Bakterienstämmen angefertigt. Dadurch war es nicht notwendig, die Transformation bei einer erneuten Expression zu wiederholen. Für die Herstellung von Dauerkulturen wird ein Klon nach der Transformation (2.2.1.9) gepickt und einer 3 ml LB-Medium/Amp/ Kana- Vorkultur hinzugegeben. Die Kultur wird bei 37 °C im Schüttelinkubator (180 rpm) für 24 h kultiviert. Die Zugabe von 100 µl 50 % Glycerolstocklösung zu je 100 µl Vorkultur unter sterilen Bedingungen erfolgte im Anschluss. In einem Ethanol (100 %)/ Trockeneis-Gemisch wurden die Dauerkulturen schockgefroren. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei -80 °C.

#### **2.2.2.3 Zellaufschluss von *E.coli***

Zur Isolierung der exprimierten Proteine aus den *E.coli* Zellen wurde zu den 8 ml Zellsuspensionen (2.2.2.1) 1 mM EDTA pH 8,0, 0,25 mg/ml Lysozym, 0,01 mg/ml DNase und 1 mM PMSF hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Sonifikation der Zellen für dreimal 10 s (Intervallpuls 15-20 %, Intervalllänge <30). Um eine Schädigung der rekombinanten Proteine zu vermeiden, wurde der Ansatz zwischen den Sonifikationschritten für 10 s auf Eis gelagert. Die folgende Zentrifugation für 20 min bei 12000 g, 4 °C diente der effizienten Trennung von intrazellulären Aggregaten (rekombinante Proteine: ZV-NS1, WNV-EP, WNV-ED3, His-Fc $\mu$ R-Ig) und der löslichen *E.coli*-Proteinfraction. Die unlöslichen Proteinaggregate wurden in 1x PBS/0,5 % TritonX-100 resuspendiert, im Potter S homogenisiert und erneut zentrifugiert. Die Homogenisierung mit Zentrifugation wurde zweimal wiederholt und diente als zusätzlicher Waschschritt, der bei der Aufreinigung des WNV-ED3 Protein nicht notwendig war. Das abschließend erhaltene Zellpellet wurde bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### **2.2.2.4 Solubilisierung der Einschlusskörper**

Mit Hilfe dieser Methode werden Proteine aus den von Bakterien gebildeten intrazellulären Aggregaten isoliert. Die gereinigten und bei -20 °C gelagerten Proteinaggregate in Pelletform (2.2.2.3) wurden aufgetaut und mit Solubilisierungspuffer versetzt. Bei der Solubilisierung des His-Fc $\mu$ R-Ig wurden 2 ml Solubilisierungspuffer pH 7,8 mit 10 mM DTT pro g Pellet für 30 min bei 50 °C inkubiert. Die Abtrennung des Überstandes vom solubilisierten Pellet erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt (20 min, 12000 g, 4 °C). Der Überstand wurde nach 2.2.2.5 weiterverarbeitet. Die Solubilisierung bei der Herstellung der Antigene erfolgte mit 10 ml Solubilisierungspuffer pH 7,8 (bei ZV-NS1 pH 8,8) pro Pellet für 0,5- 1 h bei 4 °C. Die im Puffer gelösten Proteine wurde nach Inkuba-

tion für das WNV-ED3 weiter aufgereinigt (2.2.2.5), für die Antigene WNV-EP und ZV-NS1 wurde der Proteinüberstand direkt reduziert und zurückgefaltet (2.2.2.7).

#### 2.2.2.5 Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden

##### Bedingungen

Die Ni-Affinitätschromatographie ist eine Variante der *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC), die im Rahmen dieser Arbeit dafür verwendet wurde, die rekombinanten Proteine mit His-Tag (His-Fc $\mu$ R-Ig, WNV-ED3) von *E.coli*-Proteine zu trennen. Die verwendete Ni-NTA Matrixsuspension (Qiagen) wurde zu Beginn zweimal mit der 10fachen Menge an ddH<sub>2</sub>O und Bindepuffer, bezogen auf das reine Matrixvolumen, äquilibriert. Nach Zugabe des Proteinsolubilisats (2.2.2.4) zur äquilibrierten Ni-NTA-Matrix inkubierte der Ansatz für 1 h bei 4 °C. Für die Elution der Proteine lagen zwei Methoden vor. Bei der Affinitätschromatographie zur Reinigung des His-Fc $\mu$ R-Ig wurde die Imidazolkonzentration erhöht, bei WNV-ED3 wurden zwei Elutionspuffer mit unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt.

Die His-Fc $\mu$ R-Ig-Matrixsuspension wurde nach Inkubation in PD-10 Säulen (GE Healthcare) überführt und die ungebundenen Bestandteile aufgefangen. Mit 2x 16 ml Waschpuffer A wurden die Säulen anschließend gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in 8 Fraktionen (8 x 2 ml) mit dem Elutionspuffer A.

Die WNV-ED3-Matrixsuspension wurde nach Inkubation ebenfalls in PD-10 Säulen (GE Healthcare) überführt und die ungebundene Proteinfraction aufgefangen. Die Säulen wurden mit je 15 ml Waschpuffer B gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2x 3,75 ml Elutionspuffer B1 und 2x 3,75 ml Elutionspuffer B2. Zur Kontrolle der erfolgreichen Affinitätschromatographie dienten entnommene Proben jeder Fraktion, diese wurden mittels SDS-PAGE (2.2.2.12) analysiert. Die Elutionsfraktionen lagerten bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung.

#### 2.2.2.6 Bradford-Test

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung. Die Basis dieser Methode bildet das Coomassie-Brilliant-Blau G-250. In saurem Milieu bilden sich zwischen dem Farbstoff und den kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine Komplexe. Die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm kann photometrisch bestimmt werden [95]. Für den Bradford-Test wurde das *Coomassie Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) verwendet.

Zur Ermittlung der unbekanntenen Proteinkonzentration wurden die Absorption der Proteinprobe (Doppelbestimmung) bei 595 nm gemessen und mit den Absorptionswerten eines BSA-Proteinstandards (Konzentrationen von 0-10  $\mu$ g/50  $\mu$ l, Dreifachbestimmung) verglichen. In einer 96-Well-Platte (Thermo Scientific) wurde die BSA-Proteinstandard-

reihe parallel mit den zu bestimmenden Proben in 50 µl Verdünnungslösung verdünnt. Die Zugabe von 200 µl/Well Coomassie-Brilliant-Blau G-250 Reagenz induzierte die Komplexbildung, die nach 15 min Inkubation bei RT abgestoppt werden konnte. Die Absorption wurde mit dem SPECTROstar<sup>Nano</sup> gemessen und die Konzentrationen mit Hilfe der integriert *MARS Software* ermittelt.

### 2.2.2.7 Reduzierung und Rückfaltung

Proteine, die in ihrer Struktur Disulfidbrücken besitzen, können aufgrund des reduzierenden Milieus im bakteriellen Expressionssystem nicht nativ gefaltet werden. Die richtige Faltung ist jedoch essentiell für die Funktion des Proteins und kann durch eine Rückfaltung in speziellen Rückfaltungspuffern gewährleistet werden. Zur Vorbereitung auf die Rückfaltung wurden die Elutionsfraktionen (2.2.2.5) mit 10 mM DTT für 30 min reduziert. Eine Reduzierung der WNV-ED3 Elutionsfraktionen ist nicht notwendig, da das Protein nur eine Disulfidbrücke enthält. Die Rückfaltung der Proteine erfolgte über Nacht mit der *Drip Dilution* Methode [96]. Die verwendeten Rückfaltungspuffer sind in der Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Übersicht Rückfaltungsbedingungen.

rekombinante Proteine	Rückfaltungspuffer	Rückfaltungsdauer/ -temperatur
His-Fc $\mu$ R-Ig	Rückfaltungspuffer A	24 h; 4 °C
WNV-ED3	Rückfaltungspuffer B	
WNV-EP	Rückfaltungspuffer C [97]	
ZV-NS1	Rückfaltungspuffer D	

### 2.2.2.8 Konzentrierung des Rückfaltungsansatzes

Der Rückfaltungsansatz (2.2.2.7) wurde für das Protein His-Fc $\mu$ R-Ig zunächst mit einem Steritop GV (Millipore) gefiltert, um Aggregate aus dem Ansatz zu entfernen. Mit Hilfe des Pellicon Makrokonzentratoren (Millipore) konnte durch Tangentialflussfiltration das Volumen des Rückfaltungsansatzes auf 100-150 ml reduziert werden. Der Makrokonzentratoren wurde nach Herstellerangaben mit Pellicon Kassetten 3 (NMWL 3 kDa, Millipore) eingesetzt. Der Rückfaltungsansatz des WNV-ED3 wurde ebenfalls durch den Makrokonzentratoren auf ein Volumen von 100-150 ml konzentriert. Anschließend folgte eine weitere Konzentrierung der Proteine mit Amicon® Ultra-15 Konzentratoren. Die Verwendung der Konzentratoren ist im Manual beschrieben. Für die Proteine His-Fc $\mu$ R-Ig (15,4 kDa) und WNV-ED3 (14,8 kDa) wurden Konzentratoren mit einer Membran NMWL von 3 kDa verwendet. Die Rückfaltungsansätze der WNV-EP (43 kDa) und ZV-NS1 (40 kDa) Proteine wurden nur mit Hilfe der Amicon® Ultra-15 Konzentratoren (NMWL 10 kDa) konzentriert. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte bis zu dem Vo-

lumen, bei dem erste Anzeichen von Proteindenaturierung (weiße Fäden) sichtbar wurden. Zur Überprüfung der Proteinidentität und Reinheit diente nach Konzentrierung des Proteins eine SDS-PAGE (2.2.2.12).

#### **2.2.2.9 Umpufferung mittels Zeba Spin Desalting Columns**

Zum Austausch des Pufferpuffers wurden *Zeba Spin Desalting Columns* verwendet. Die Durchführung des Pufferaustausches ist im Manual der Säulen beschrieben.

#### **2.2.2.10 Polyhistidin<sub>10</sub>-Tag Abspaltung mit der 3C-Protease**

Das Polyhistidin<sub>10</sub>-Tag wurden im Rahmen dieser Arbeit von dem rekombinanten WNV-ED3 Protein durch die 3C-Protease (BNITM) abgetrennt. Die Abspaltung des Polyhistidin<sub>10</sub>-Tags erfolgte unter zur Hilfenahme der Glutathione HiCap Matrix (Qiagen). 1,5 ml Matrix wurde zu Beginn mit 15 ml ddH<sub>2</sub>O und 6 ml Bindepuffer 3C äquilibriert. Danach wurde 0,5 mg 3C-Protease an die Glutathionmatrix über dessen GST-Tag gebunden. Der Ansatz inkubierte für 1 h bei 4 °C und wurde anschließend mit 15 ml Puffer 3C gewaschen. 1 mg des Proteins wurden in den Puffer 3C umpuffert (2.2.2.9) und mit der 3C-Protease-gebundenen Matrix über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Elution erfolgte in 3 Schritten: einmal mit 1 ml Puffer 3C, zweimal mit 2 ml Puffer 3C. Zur Analyse der eluierten Fraktionen dienten die SDS-PAGE (2.2.2.12) und der Bradford-Test (2.2.2.6).

#### **2.2.2.11 Gelfiltration**

Die Gelfiltration wurde als zusätzlicher Reinigungsschritt bei der Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Proteine eingesetzt. Durch das poröse Trägermaterial mit definierten Maßen können die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt werden. Für die Gelfiltration wurden eine *HiLoad 16/600 Superdex® 75* und eine *Superdex® 75 10/300 GL* (GE Healthcare) je nach Proteinmenge eingesetzt. Die Steuerung des Gelfiltrationsvorganges erfolgte mit dem *Äkta™ Purifier System* desselben Herstellers bei 10 °C. Die Säulen wurden zu Beginn in Gelfiltrationspuffer mit einer Flussrate von 0,4 ml/min und 1 ml/min (HiLoad) für 2 Säulenvolumen äquilibriert. Die zuvor in Gelfiltrationspuffer (Tab. 6) umpufferten (2.2.2.9) und aufkonzentrierten (2.2.2.8) Proben wurden in das System injiziert und während des Laufs die Fraktionen gesammelt. Bei der *Superdex® 75 10/300 GL* wurden 1 ml Fraktionen gesammelt, bei der *HiLoad* 3 ml große Fraktionen. Zur Identifikation der proteinhaltigen Fraktionen dienten die mit dem UV-Element gemessenen Absorptionswerte des Eluats bei 280 nm. Die Fraktionen mit einem deutlichen *Peak* im Chromatogramm/ hohen Absorptionswert wurden konzentriert (2.2.2.8) und mittels SDS-PAGE (2.2.2.12) analysiert. Bis zur Weiterverarbeitung lagerten die Proteine bei -20 °C.

Tabelle 6: Übersicht Gelfiltrationspuffer der rekombinanten Proteine.

rek. Proteine	Rückfaltungspuffer
His-Fc $\mu$ R-Ig	Gelfiltrationspuffer A
WNV-ED3	Gelfiltrationspuffer B
WNV-EP	Gelfiltrationspuffer C
ZV-NS1	Gelfiltrationspuffer D

### 2.2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit

#### Coomassie Blaufärbung

Die SDS-PAGE mit Coomassie Blaufärbung wurde zur Überprüfung der Expression und der gereinigten Proteine eingesetzt [93]. Die resultierenden Proteinbanden wurden mit dem Größenstandard *PageRuler prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)* verglichen und der Bandenmuster analysiert. Die Proteinproben wurden zur Analyse unter reduzierten Bedingungen mit dem 4x Lämmli-Ladepuffer (reduziert) versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Zur Analyse der Proteine unter nicht reduzierten Bedingungen wurden die Proben mit 4x Lämmli-Ladepuffer (nativ) verdünnt.

### 2.2.2.13 HRP-Markierung der rekombinanten Antigene

Die Kopplung der Meerrettichperoxidase (HRP, Sigma-Aldrich) an die rekombinanten Virusproteine wurde durch die im Folgenden beschriebene Methode ermöglicht. Die HRP (4 mg/ml) wurde zu Beginn durch Natriumperiodat (3,5 mg/ml) während eines 20 minütigen Inkubationsschrittes (RT) aktiviert. Durch die Dialyse des Ansatzes in 1 mM Acetatpuffer pH 4,4 über Nacht (4 °C) konnte das Natriumperiodat wieder entfernt werden. Die aktivierte HRP wurde nach der Dialyse mit 0,2 mM Carbonatpuffer auf pH 9,5 gebracht. Die Initialisierung der Markierungsreaktion erfolgte nach der Zugabe des Proteins zur aktivierten HRP (Tab. 7).

Tabelle 7: HRP-Markierungsbedingungen

	Proteinmenge	HRP-Menge	Markierungspuffer
WNV-ED3	0,5 mg	4 mg	Markierungspuffer B
WNV-EP	0,5 mg	0,5 mg	Gelfiltrationspuffer C
ZV-NS1	0,2 mg	0,2 mg	Gelfiltrationspuffer D

Mit 1 mM Carbonatpuffer pH 9,3 wurde der pH des Markierungsansatzes auf pH 9,3 eingestellt und nachfolgend auf  $\frac{1}{4}$  des Ausgangsvolumens mit Amicon® Ultra-0,5 Konzentratoren (siehe 2.2.2.8) konzentriert. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zur Stabilisierung der Bindung zwischen Protein und HRP wurde Natriumborhydrid (0,2 mg/ml) hinzugegeben (Inkubation: 5 min, RT) und die Lösung anschließend 1:10 mit Einfrierlösung verdünnt. Eine längere Lagerung der Antigene ist bei -20 °C möglich.

## 2.2.3 Immunologische Nachweisverfahren

### 2.2.3.1 Anti ZIKV Virus ELISA (IgM/IgG), Euroimmun AG

Der Anti-ZIKV Virus IgM und IgG ELISA der Euroimmun AG wurde wie im Testkitmanual beschrieben eingesetzt und ausgewertet. Beide ELISA beruhen auf dem Prinzip des indirekten ELISA.

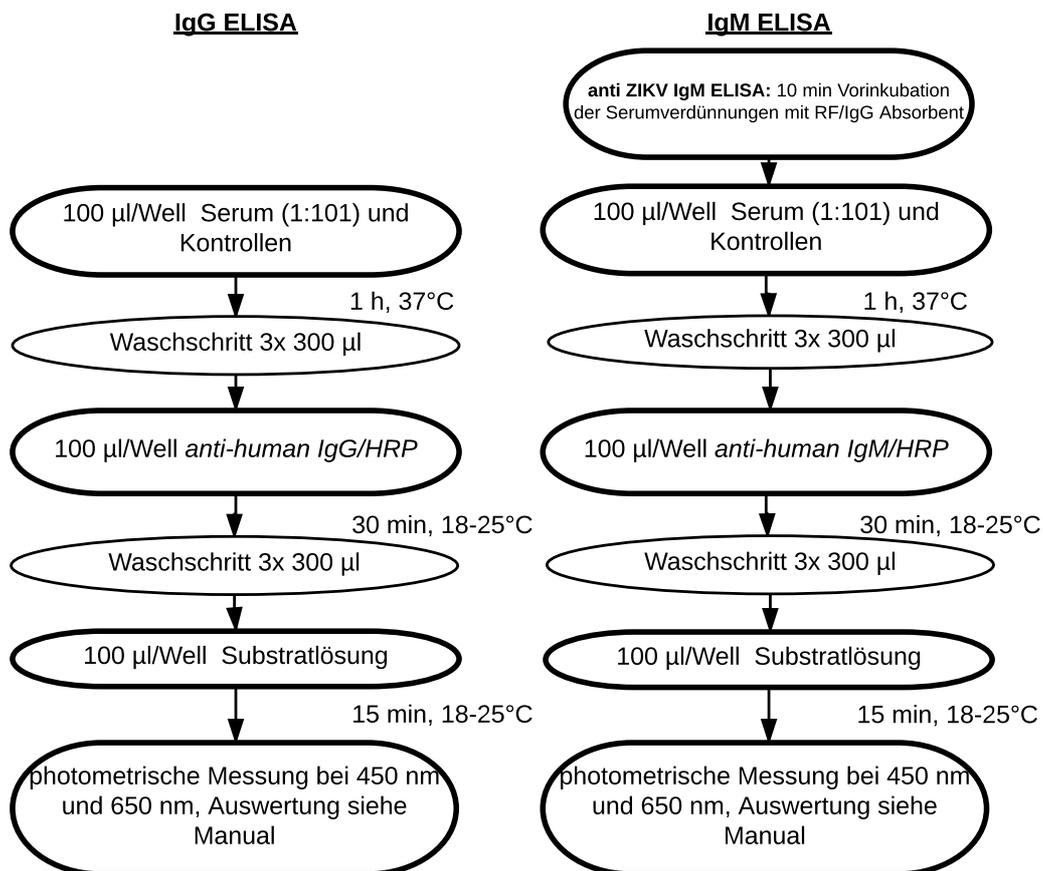


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Anti ZIKV Virus ELISA (IgM/IgG). Euroimmun AG

### 2.2.3.2 VectoCrimea-CHF-IgG/IgM, Vector Best

Die VectoCrimea-CHF-IgG und IgM Kits von Vector Best wurden wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

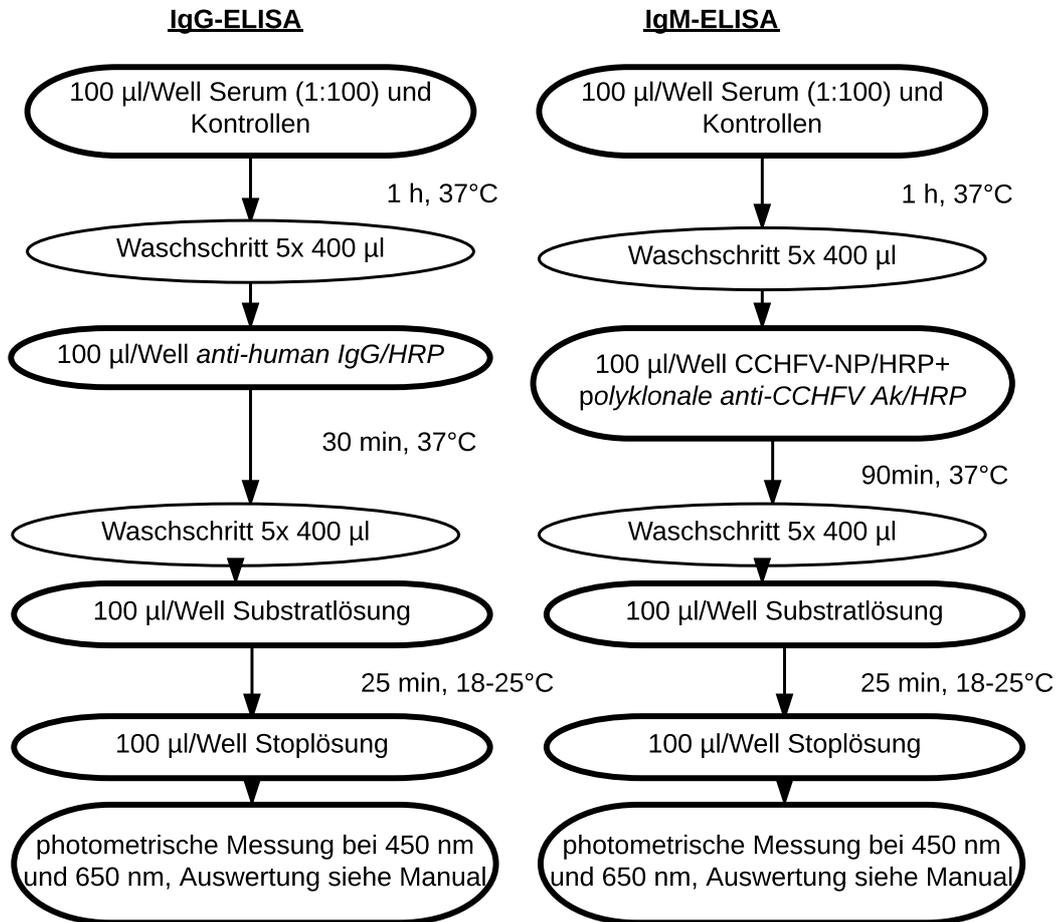


Abbildung 13: Schematische Darstellung des VectoCrimea-CHF-IgG (indirekter-ELISA) und VectoCrimea-CHFV-IgM ( $\mu$ -Capture-ELISA). Vector Best

### 2.2.3.3 West Nile Virus IgM Capture DxSelect™, Focus Diagnostics

Der  $\mu$ -Capture-ELISA von Focus Diagnostics wurde wie im Manual beschrieben eingesetzt und ausgewertet.

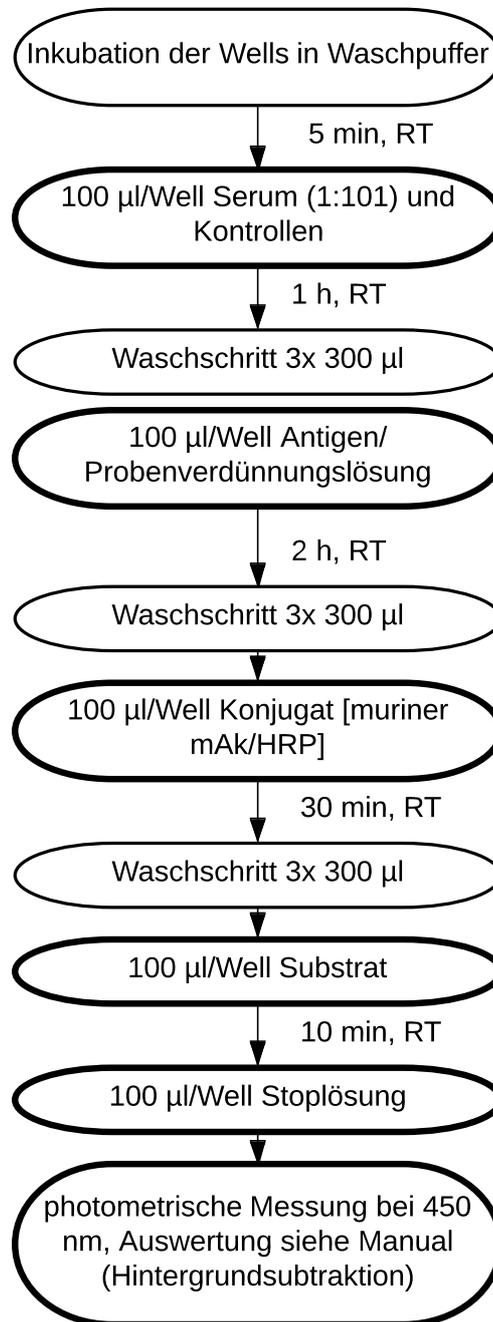


Abbildung 14: Schematische Darstellung des West Nile Virus IgM Capture DxSelect™. Focus Diagnostics

### 2.2.3.4 Schachbrett-ELISA (indirekter ELISA)

Diese Form des indirekten ELISAs wurde zur Ermittlung der effizientesten His-Fc $\mu$ R-Ig Beschichtungskonzentration eingesetzt. 12 ELISA Streifen, bestehend aus je 8 Kavitäten/Wells (Thermo Scientific, Nunc), wurden mit Proteinkonzentrationen von 5 µg/ml bis 15 µg/ml beschichtet und über 2- 7 Tage bei 4 °C in einer feuchten *Lock&Lock* Box

(Otto Office) inkubiert. Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurden die beschichteten Streifen mit Blockierungspuffer 2 (BP2) zweimal mit 200 µl/Well mittels *Microplate Washer* (Thermo Scientific) gewaschen und für 2 h im letzten Waschschrift inkubiert. Der 1. Antikörper anti-Polyhistidin (Sigma-Aldrich) wurde in BP 2 verdünnt und mit absteigender Konzentration von 1:500 (1 Streifen) bis 1:1024000 (12 Streifen) mit je 50 µl in die Kavitäten pipettiert. Die Inkubation der beschichteten Streifen dauerte 2 h bei RT mit dem 1. Antikörper. Im folgenden Waschschrift (3x 300 µl/Well) mit Waschpuffer BP2 wurde der 1. Antikörper entfernt. Nach Zugabe von 50 µl/Well des 2. Antikörpers anti-Maus IgG (H+L)/HRP (1:1000 in BP2, Thermo Scientific) wurde die Streifen für 1h bei RT inkubiert. Danach folgte ein erneuter Waschschrift mit BP2. Die Entwicklungsreaktion startete mit der Zugabe von 50 µl TMB (KPL)/Well und wurde nach 20 min mit 50 µl 1 N Schwefelsäure (Merck) abgestoppt. Die 12 ELISA-Streifen wurden bei 450 nm und 620 nm im Spectrostar<sup>Nano</sup> (BMG, Labtech) gemessen und die Differenz zwischen 450 nm und 620 nm der Software entnommen.

Der ELISA wurde, durch die absteigende Konzentration der His-Fc $\mu$ R-Ig Beschichtung von Reihe A-H und die absteigende Konzentration des 1. Ak von Streifen 1-12, Schachbrett-ELISA genannt.

#### 2.2.3.5 $\mu$ -Capture ELISA

Für den  $\mu$ -Capture ELISA wurde eine 4 µg/ml anti-human IgM (KPL) beschichtete Platten aus der *Diagnostic Development Laboratory* (DDL) Produktion (BNITM) verwendet. Für die Herstellung der beschichteten Platten wurden diese mit 4 µg/ml anti-human IgM in 1x PBS pH 7,4 über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden die Platten zweimal mit Blockierungspuffer gewaschen und im letzten Waschschrift für 2 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden im folgenden Schritt zweimal mit 1x PBS pH 7,4 gewaschen und anschließend mit dem *Liquid Plate Sealer* (Candor) anhand des Herstellerprotokolls stabilisiert und getrocknet.

Die zu untersuchten Serumproben wurden in SDB verdünnt (1:100 finale Verdünnung) und 50 µl/Well 1 h bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 300 µl/Well Waschpuffer E, der dreimal (sechsmal im WNV- $\mu$ -Capture ELISA) wiederholt wurde. Der *Microplate Washer* (Thermo Scientific) ermöglichte eine Automatisierung der Waschschrift im ELISA. Das verwendete Antigen wurde in CDB verdünnt (CCHFV-NP/HRP: 1.50.000, WNV-EP/HRP: 1:32.000, WNV-ED3/HRP: 1:125.000) und 50 µl/Well für 1 h bei RT inkubiert. Die beschichteten ELISA Streifen wurden erneut mit Waschpuffer E gewaschen und abschließend mit 100 µl TMB/Well für 10-20 min entwickelt. Die Abstopfung der Frabreaktion erfolgte mit 100 µl 1 N Schwefelsäure/Well und die Extinktionswerte bei 450 nm und 620 nm wurden im Spectrostar<sup>Nano</sup> gemessen.

### 2.2.3.6 IgG-Immunkomplex ELISA

Der Immunkomplex ELISA zur Detektion von anti-Flavivirus IgG-Antikörpern (TBEV, WNV) wurde 2011 von Prof. Schmitz (BNITM) entwickelt und ist bereits patentiert [85]. Der ELISA beruht auf der nicht-kovalenten Bindung der Immunglobulin-ähnlichen Domänen des CD32 Fc-Rezeptors (His-FcγR-Ig, 5 µg/ml) an die Oberfläche der ELISA-Streifen (Thermo Scientific, Nunc). 96-Wellplatten bestehend aus 12 ELISA-Streifen wurden von der DDL Produktion (BNITM) hergestellt und mit einer hauseigenen Qualitätskontrolle überprüft. Die ELISA-Platten wurden für 7 Tage mit 5 µg/ml His-FcγR-Ig in Beschichtungspuffer bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer C gewaschen und anschließend mit dem *Liquid Plate Sealer* anhand der Herstellerangaben stabilisiert und getrocknet.

Die Serumverdünnung in SDB (1:200 finale Konzentration) und das Antigen in CDB (finale Konzentrationen: CCHFV-NP/HRP tierisch/human: 1:250.000/1:240.000, WNV-ED3/HRP 1:125.000, WNV-EP/HRP: 1:15.000 ) wurden mit je 25 µl simultan zur beschichteten Wellplatte hinzugegeben. Der Ansatz inkubierte für 24 h bei 4 °C und wurde anschließend mit Waschpuffer E dreimal mit 300 µl/Well gewaschen. Mit der Zugabe von 100 µl TMB/Well begann die Entwicklung des ELISA für 10 min, die mit 100 µl 1 N Schwefelsäure/Well abgestoppt wurde. Die Messung der 96-Wellplatte erfolgte im Spectrostar<sup>Nano</sup> bei 450 nm und 620 nm. Die Differenzwerte der Extinktionswerte von 450 nm und 620 nm wurden für die Auswertungen eingesetzt.

### 2.2.3.7 IgM-Immunkomplex ELISA

Der Immunkomplex ELISA zur Detektion von virusspezifischen IgM-Antikörper ist die Technologie, die im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt wurde. Das rekombinant hergestellte His-FcγR-Ig wurde hierfür an die Welloberfläche einer 96 Wellplatte (bestehend aus 12 ELISA-Streifen) gebunden. His-FcγR-Ig wurde in Beschichtungspuffer verdünnt und 50 µl pro Well pipettiert. Für die Bindung der Rezeptordomäne an die Oberflächen der Wellplatte wurde diese 2-7 Tage bei 4 °C in einer feuchten *Lock&Lock*-Box gelagert. Anschließend wurde die Bindung stabilisiert. Hierfür wurde zuvor die Platte mit BP2 für 2x 200 µl/ Well mittels *Microplate Washer* (Thermo Scientific) gewaschen und im letzten Waschschrift für 2 h inkubiert. BP2 wurde hinterher durch einen Waschschrift (2x 200 µl) mit 1x PBS pH 7,4 entfernt und 50 µl *Liquid Plate Sealer* (Candor)/Well hinzugegeben. Der Stabilisierungsvorgang dauerte 1 h. Der *Liquid Plate Sealer* wurde abgesaugt und die beschichtete Platte für 90 min bei 37 °C getrocknet. Mit der Vakuummachine C200 (Multivac) wurden die Platten mit einem Antikondensationsbeutel (Long Life for Art) in Aluverbundbeutel A20 T (Long Life for Art) eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

Vor der Verwendung der Platten im IgM-IC-ELISA erfolgte eine Äquilibrierung der Streifen mit Waschpuffer E. Es wurde dreimal mit 300 µl/Waschpuffer E/ Well gewaschen und die Platte im letzten Waschschrift für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Serumverdünnung in SDB (finale Konzentration, Tab. 8) simultan mit der Antigenverdünnung in CDB (finale Konzentrationen, Tab. 8) mit je 25 µl in die Wells pipettiert und der Ansatz für 4 h/ 24 h bei 4 °C in einer feuchten *Lock & Lock*-Box inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Antigens und Serum diente ein Waschschrift (Tab. 8). Die Reaktionsentwicklung erfolgte für 10-20 min mit 100 µl TMB, danach wurde die Reaktion mit 100 µl 1 N Schwefelsäure abgestoppt und die Extinktionswerte im Spectrostar<sup>Nano</sup> (450 nm-620 nm) gemessen.

Tabelle 8: Detaillierte Übersicht der IgM-IC-ELISA.

IC-ELISA	Konjugate	Serum-probe	Serumverdün-nung [finale Konzentrationen]	Konjugatver-dünnung [finale Konzentrationen]	IC-Inkubation	2.Waschschritt	Entwicklung [min]
CCHFV-IgM-IC-ELISA	CCHFV-NP/HRP	tierisch	1:100	1:150.000	24 h	3 x 300 µl	10
		human		1:50.000			
			1:50	1:8.000	4 h		20
WNV-IgM-IC-ELISA	WNV-ED3/HRP	human	1:100 <sup>*</sup>	1:250.000	24 h	3x 300 µl, 30 min Inkubation im letzten Waschschritt	20
	WNV-EP/HRP		1:100	1:50.000			
ZIKV-IgM-IC-ELISA	ZIKV-NS1/HRP	human	1:100	1:50.000	24 h	3x 300 µl, 30 min Inkubation im letzten Waschschritt	10

\*Die Seren wurde in SDB mit 1:20 RF/IgG-Absorbent (IBL) verdünnt.

### **2.2.3.8 Schnelltest basierend auf Aggregation von Latexpartikeln**

Die Möglichkeit, auf Basis des His-Fc $\mu$ R-Ig Capture-Moleküls einen Schnelltest zu entwickeln, wurde mit dieser Methode untersucht. Hierfür wurde 1 mg/ml His-Fc $\mu$ R-Ig in 10 mM MES pH 7,4 kovalent an blaue Latexpartikel (400 nm, Innova Bioscience) nach Herstellerangaben gebunden. Die kovalente Bindung von anti-human IgM-Antikörpern (KPL) erfolgte mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Reaktionspuffer A, ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Die beschichteten Latexpartikel (0,02 % final) wurden mit humanem IgM (Acris-Antibodies) in Konzentrationen von 1- 4  $\mu$ g für 1 h (RT) inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation für 1 min bei 10.000 g wurden die Latexpartikel wiederholt für 1 h (RT) inkubiert. Aus dem Inkubationsansatz wurden 3  $\mu$ l auf einen Objektträger übertragen und per Auge sowie mit dem Mikroskop Evos xl (100x Vergrößerung) begutachtet. Die Bindung von IgM-Immunkomplexen wurde mit der Zugabe von verdünntem anti-CCHFV IgM positiven Serum (1:10 final) und 4  $\mu$ g CCHFV-NP Protein untersucht. Die beschichteten Latexpartikel wurden für 2 h bei RT inkubiert, für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert und erneut für 2 h (RT) inkubiert. Anschließend wurden 3  $\mu$ l auf einen Objektträger pipettiert und per Augen und mittels Evos xl (100x Vergrößerung) analysiert.

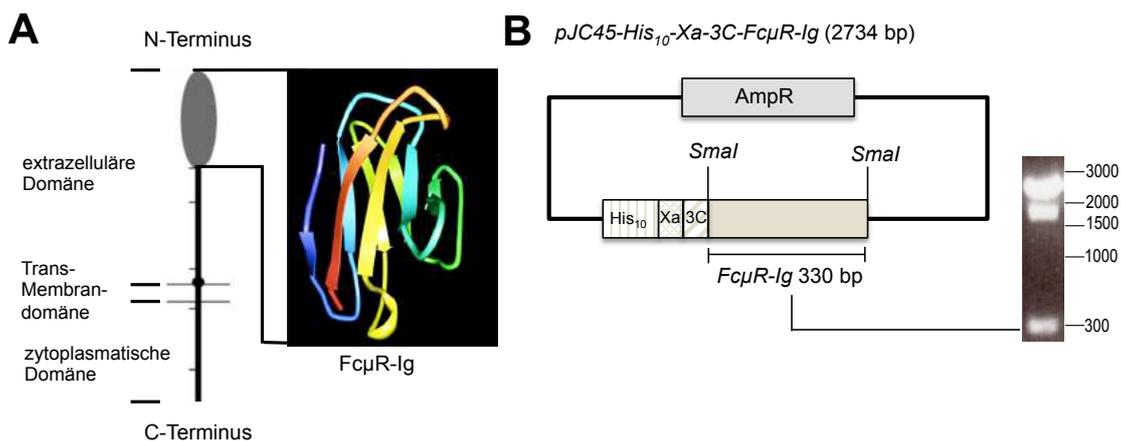
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung eines neuen Capture-Moleküls für die Entwicklung des IgM-Immunkomplex-ELISA

Die Bindung von IgM/Antigen-Immunkomplexen ist der essentielle Schritt des IgM-Immunkomplex-ELISA. Nach Literaturrecherche wurde die Immunglobulin-ähnliche Domäne des IgM Fc-Rezeptors (His-Fc $\mu$ R-Ig) als zukünftiges Capture-Molekül für das neue ELISA-System ausgewählt. Der Fc $\mu$ -Rezeptor wurde 2009 durch funktionelle Experimente als IgM-bindender Rezeptor identifiziert. Es ist der einzige humane Rezeptor, der nur Antikörper des IgM-Isotyps bindet und keine Affinität zu IgA-Antikörper (Ak) besitzt [75]. Die Rezeptordomäne wurde für die Verwendung im IgM-IC-ELISA rekombinant hergestellt.

#### 3.1.1 Klonierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die für die Immunglobulin-ähnlichen Domäne des IgM Fc-Rezeptors Fc $\mu$ R/TOSO/FAIM3 codierende cDNA (Abb. 15A) in den zuvor mit *Sma*I geschnittenen *pJC45-His<sub>10</sub>-Xa-3C* Vektor kloniert. Durch In-Fusion® Klonierung wurde die durch die Oligonukleotide #119 und #120 aus dem *pGEM-T-HsFc $\mu$ R* (Sino Biological) amplifizierte Ig-Domäne in den Vektor integriert (Abb. 15B). Mit einer Größe von 330 bp konnte die amplifizierte Domäne mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 15B).



**Abbildung 15: Struktur des IgM Fc-Rezeptors mit der schematischen Darstellung des *pJC45-His<sub>10</sub>-Xa-3C-Fc $\mu$ R-Ig***

**(A) Struktur Fc $\mu$ R.** Der IgM Fc-Rezeptor besteht aus drei Domänen: extrazelluläre Domäne, Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen C-terminalen Domäne. Die Immunglobulin-ähnliche Domäne (graues Oval) ist ein Teilbereich der extrazellulären Domäne des Fc-Rezeptors (Abbildung verändert nach [82]). Durch das Swiss-Model (ExPasy) konnte auf Basis der 1XED Struktur ein theoretisches Strukturmodell erstellt werden.

**(B) Schematische Darstellung des *pJC45-His<sub>10</sub>-Xa-3C-Fc $\mu$ R-Ig*.** Das Fc $\mu$ R-Ig (360 bp) wurde nach Amplifikation mit den Oligonukleotiden #119 und #120 in den Vektor *pJC45-His<sub>10</sub>-Xa-3C* über In-Fusion® Klonierung integriert. Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz (AmpR) sowie zwei Protease-Schnittstellen (Xa, 3C) nach dem Polyhistidin-Tag (His<sub>10</sub>-Tag).

### 3.1.2 Expression und Reinigung

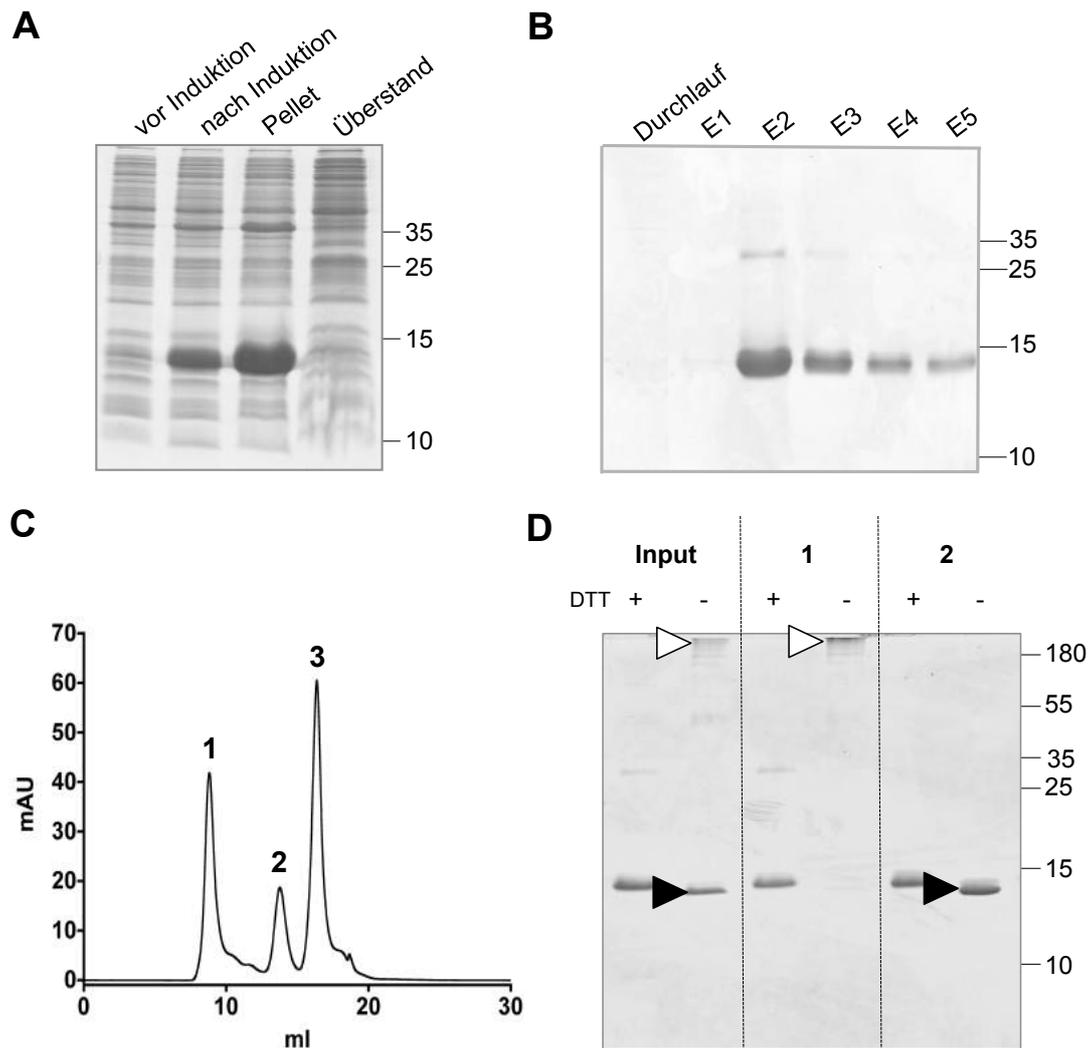
Nach erfolgreicher Klonierung wurde der Expressionsvektor *pJC45-His<sub>10</sub>-3C-Xa-Fc $\mu$ R-Ig* in die Bakterienzellen *pAPlacI BL21 E.coli* transformiert. Die Expression des *Fc $\mu$ R-Ig-His* wurde nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit IPTG induziert. Mit dem Vergleich der Zellkultur vor und nach Induktion mittels SDS-PAGE (Abb. 16A) wurde die Proteinbiosynthese analysiert.

Nach der Trennung der unlöslichen intrazellulären Aggregate von löslichen Zellbestandteilen der Bakterienzellen konnte His-Fc $\mu$ R-Ig in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 16A). Die Rezeptordomäne wurde durch die Bakterienzellen in intrazelluläre Aggregate verpackt, die durch Zellyse und Sonifizierung isoliert wurden. Die anschließende Solubilisierung der Aggregate diente dem Herauslösen von His-Fc $\mu$ R-Ig, das durch die Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen weiter aufgereinigt wurde (Abb. 16B).

Die Proteinausbeute, bezogen auf 2 l Expressionskultur nach Ni-Aufreinigung, betrug im Durchschnitt  $45,1 \pm 6,7$  mg (n=5). Durch oxidative Rückfaltung wurde das His-Fc $\mu$ R-Ig gefaltet. Anschließend wurde der Ansatz mittels Gelfiltration der Größe nach aufgetrennt, um bei der Rückfaltung entstandene Proteinaggregate und –monomere zu trennen (Abb. 16C).

Zur Analyse der Proteinfractionen wurden Proben genommen und diese vergleichend mit und ohne Zusatz von Dithiothreitol (DTT) via Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 16D). DTT kann intermolekulare Disulfidbrücken durch seine reduzierende Eigenschaft aufbrechen. Durch die Zugabe von DTT zu den Proben werden auch Proben mit Proteinaggregaten so weit reduziert, dass sie sich nicht mehr von Monomeren unterscheiden lassen. Wird jedoch eine Aggregatprobe im nicht reduzierten Zustand (-DTT) aufgetragen, kann man diese durch die höhermolekulare Gelbande von den Monomeren differenzieren.

Durch die beschriebene Abfolge der Methoden konnte aus einer 2 l Expressionskultur eine finale Proteinausbeute von  $5,1 \pm 0,7$  mg (n=5) His-Fc $\mu$ R-Ig (Monomer) hergestellt werden.



**Abbildung 16: Reinigung und Expression His-Fc $\gamma$ R-Ig.**

**(A) Expression His-Fc $\gamma$ R-Ig.** Auf dem Polyacrylamidgel (20 %) wurde eine Zellkulturprobe vor und nach Induktion mit IPTG (1 mM) aufgetragen. Die gereinigten intrazellulären Aggregate (Pellet) wurden, im Vergleich zur löslichen Proteinfraction der Bakterien (Überstand), ebenfalls parallel im Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die Rezeptordomäne besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 15,4 kDa.

**(B) Denaturierende Ni-Affinitätschromatographie.** Die an die Matrix ungebundenen Proteine (Durchlauf) und gebundenen Proteine (E1-E5) wurden in Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE (20 %) analysiert. Das Gel wurde mit einer Coomassie Brilliant Blau Lösung gefärbt.

**(C) Gelfiltration des zurückgefalteten His-Fc $\gamma$ R-Ig.** Nach der Affinitätschromatographie wurde das Protein reduziert und oxidativ zurückgefaltet. Das konzentrierte, gefaltete Protein wurde mittels Gelfiltration der Größe nach aufgetrennt. Das abgebildete Chromatogramm einer repräsentativen Gelfiltration zeigt drei Peaks. Im dritten Peak wurden niedermolekulare Peptide (<15 kDa) vom System detektiert. mAU: Absorptionseinheit

**(D)** Proben der Fraktionen des ersten und zweiten Peaks wurden im Polyacrylamidgel (20 %) mit einer Probe der Proteinfraction vor der Gelfiltration verglichen. Der Vergleich der Gelproben ohne DTT zeigte die Trennung der Aggregate (weißer Pfeil) und Monomere (schwarzer Pfeil) durch die Gelfiltration. 2  $\mu$ g Protein/Gelspur.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde His-Fc $\gamma$ R-Ig in Form von Monomeren reproduzierbar und in größeren Mengen rekombinant hergestellt, so dass es als Basismolekül für die Entwicklung des IgM-IC-ELISA eingesetzt werden konnte.

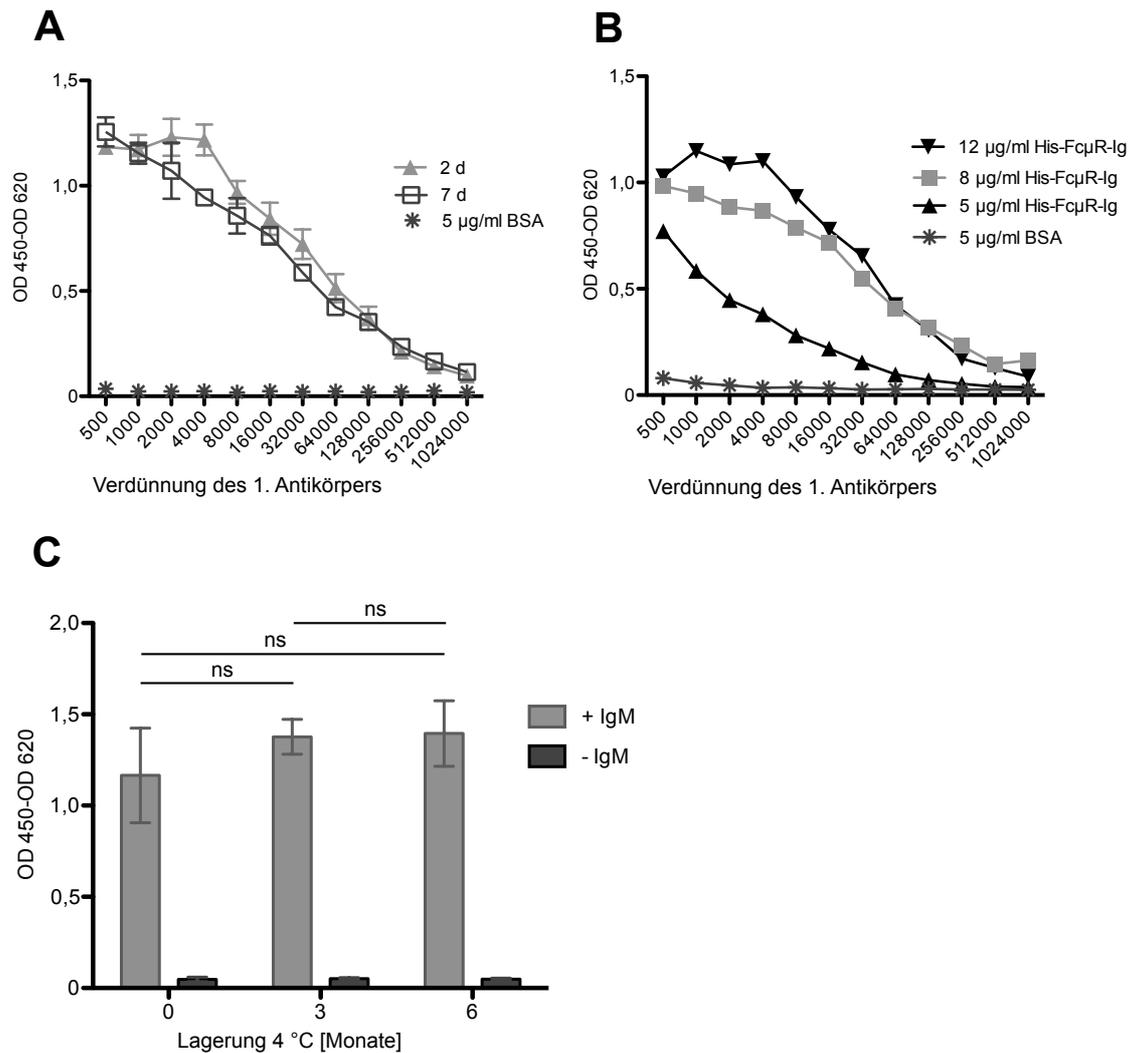
## 3.2 Bindungseigenschaften der Immunglobulin-ähnlichen Domäne des Fc $\mu$ -Rezeptors

### 3.2.1 Beschichtung von ELISA-Streifen mit His-Fc $\mu$ R-Ig

Für die Verwendung des His-Fc $\mu$ R-Ig als Capture-Molekül wurden zunächst die optimalen Beschichtungsbedingungen zur nichtkovalenten Bindung an die ELISA-Streifen (Nunc, Thermo Scientific) bestimmt. Zur Ermittlung der am besten geeignetesten Proteinkonzentration und Beschichtungszeit wurde zur Quantifizierung der Oberflächenbedeckung ein indirekter ELISA verwendet.

Mit 12  $\mu$ g/ml His-Fc $\mu$ R-Ig beschichteten ELISA-Streifen wurde zu Beginn getestet, ob eine Inkubation von 2 Tagen bei 4 °C im Vergleich zu 7 Tagen bei 4 °C bereits ausreicht, um eine vollständige Proteinbedeckung auf den ELISA-Streifen zu gewährleisten. Im indirekten ELISA konnte kein Unterschied zwischen den untersuchten Beschichtungszeiten beobachtet werden (Abb. 17A). Daher wurde die Beschichtungszeit auf 2 Tage festgelegt. In einem anschließenden Versuch wurde untersucht, ob eine Reduzierung der Beschichtungskonzentration des His-Fc $\mu$ R-Ig ohne signifikante Änderung der Signalthöhen im indirekten ELISA garantiert werden kann. Bei der Verwendung einer Beschichtungskonzentration von 5  $\mu$ g/ml konnte eine Abnahme in den Signalthöhen im Vergleich zu 12  $\mu$ g/ml festgestellt werden, bei der Verwendung von 8  $\mu$ g/ml war dies nicht der Fall (Abb. 17B). 8  $\mu$ g/ml His-Fc $\mu$ R-Ig wurde als geringstmögliche Beschichtungskonzentration für weitere Versuche ausgewählt.

Die Stabilität der 8  $\mu$ g/ml His-Fc $\mu$ R-Ig-Beschichtung wurde nach 2 Tagen Beschichtungsinkubation bei 4 °C, Blockierung mit 1 % BSA und anschließender Trocknung/Stabilisierung ermittelt. Hierfür wurde die IgM-Immunkomplex Bindung (humanes IgM+ anti-human IgM/HRP: Immunkomplex) an die beschichteten Platten über einen definierten Zeitraum untersucht. Die in Aluverbundbeutel eingeschweißten Platten wurden bis zu 6 Monate bei 4 °C gelagert. Die Extinktionswerte nach simultaner Inkubation (24 h) mit humanem IgM und anti-human IgM/HRP wurden gemessen und verglichen (Abb. 17C).



**Abbildung 17: Beschichtung ELISA-Streifen mit His-Fc $\gamma$ R-Ig.**

**(A) Beschichtungszeit.** Quantifizierung der Oberflächenbedeckung; indirekter ELISA (Schachbrett): 1.Ak. Maus anti-Polyhistidin, 2.Ak. Ziege anti-Maus IgG (H+L)/HRP, Auftragung Extinktionswerte (OD450-620 nm) gegen logarithmische primäre Antikörperverdünnung; Vergleich Extinktionswerte nach 4 d und 7 d Plattenlagerung bei 4 °C; Negativkontrolle: 5 µg/ml BSA-Beschichtung; Fehlerbalken: Standardabweichung n=2

**(B) Beschichtungskonzentration.** Bestimmung geringstmögliche Beschichtungskonzentration bei 2 d Plattenbeschichtung; indirekter ELISA (Schachbrett): 1.Ak. Maus anti-Polyhistidin, 2.Ak. Ziege anti-Maus IgG (H+L)/HRP, Auftragung Extinktionswerte (OD450-620 nm) gegen logarithmische primäre Antikörperverdünnung; Untersuchung von 5, 8 und 12 µg/ml His-Fc $\gamma$ R-Ig-Beschichtung (50 µl/Well); Negativkontrolle: 5 µg/ml BSA-Beschichtung

**(C) Beschichtungsstabilität.** Testung IgM-IC-Bindung zur Ermittlung der Plattenstabilität von 8 µg/ml His-Fc $\gamma$ R-Ig; ELISA: simultane Inkubation (24 h) human IgM (1:50)+ Ziege anti-human IgM/HRP (1:2000) auf 8 µg/ml His-Fc $\gamma$ R-Ig-Beschichtung; Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; Auftragung Extinktionswerte (OD450-620 nm) 0, 2 und 6 Monate Lagerung; Fehlerbalken: Standardabweichung n=3

Es konnte keine Qualitätsabnahme mit zunehmender Plattenlagerungszeit beobachtet werden, wodurch die stabilisierten und getrockneten His-Fc $\gamma$ R-Ig ELISA-Streifen innerhalb des definierten Zeitrahmens für die Testentwicklung des IgM-IC-ELISA verwendet wurden.

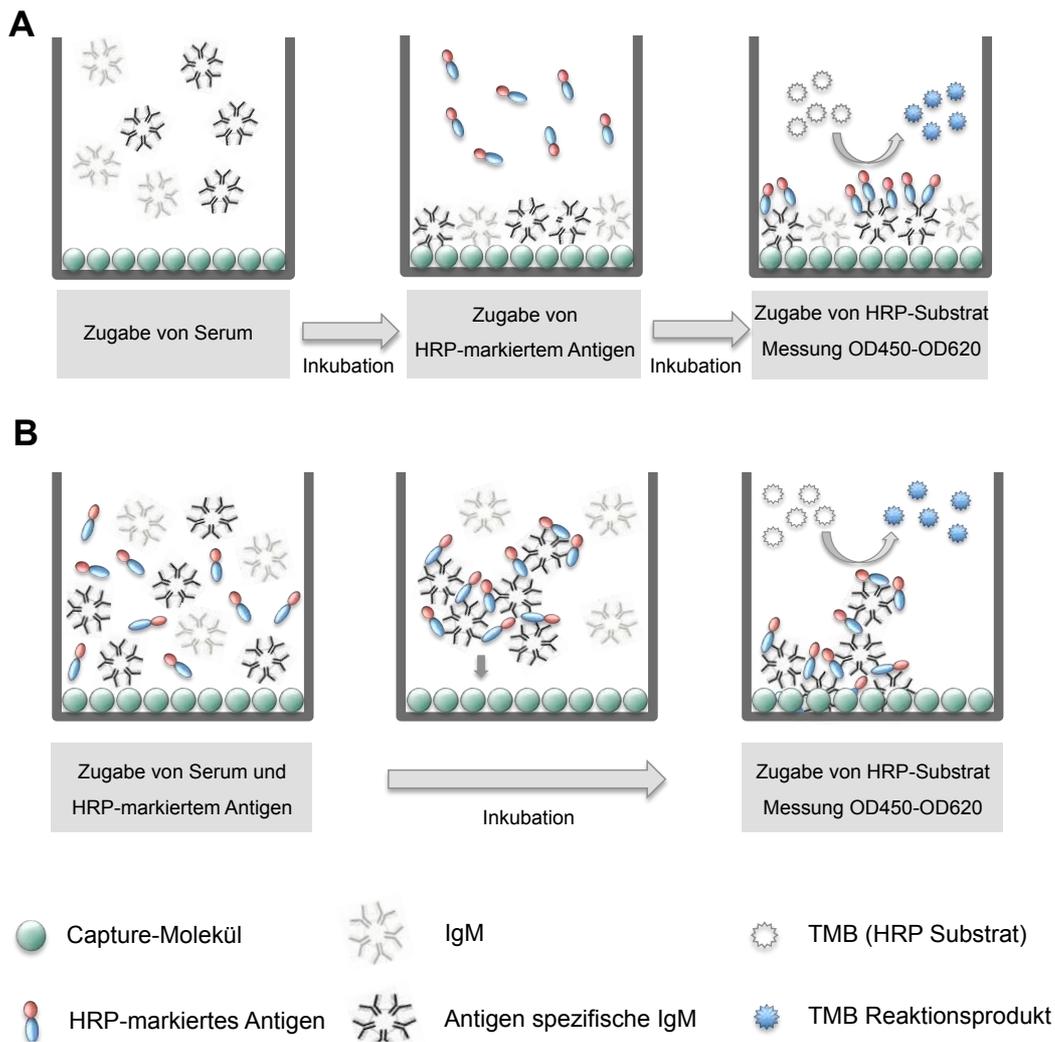
### **3.2.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften vom His-Fc $\mu$ R-Ig**

#### **3.2.2.1 Spezifische Bindung von IgM-Antikörpern in Form von IgM/Antigen-Immunkomplexen**

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften war ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit um festzustellen, ob die Immunglobulin-ähnliche Domäne des Fc $\mu$ R als Capture-Molekül eingesetzt werden kann. Hierfür wurde zunächst untersucht, ob IgM-Ak vom Capture-Molekül in alleiniger Form oder in Form eines mit dem jeweiligen Antigen gebildeten Immunkomplexes gebunden werden.

Bei dem  $\mu$ -Capture-ELISA (Abb. 18A) wird das IgM-Ak enthaltene Serum zunächst allein mit dem Capture-Molekül inkubiert, anschließend wird das Serum abgewaschen und das Enzym-gekoppelte Antigen hinzugegeben. Bei dieser Methode können, aufgrund der sukzessiven Zugabe der einzelnen Komponenten, keine IgM/Antigen-Immunkomplexe gebildet werden.

Dies ist anders bei dem IgM-IC-ELISA (Abb. 18B). Hier wird das Serum zusammen mit dem Enzym-gekoppelten Antigen inkubiert. Dadurch bilden sich in Gegenwart des Capture-Moleküls IgM/Antigen-Immunkomplexe aus und werden gebunden.



**Abbildung 18: Schematische Darstellung der ELISA.**

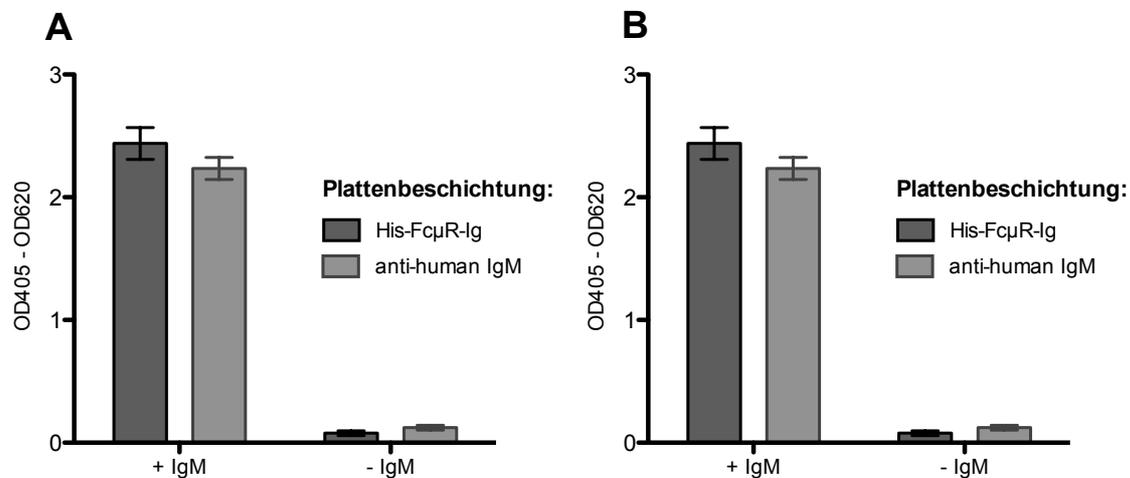
**(A)  $\mu$ -Capture-ELISA.** Sukzessive Zugabe von Serum und HRP-markiertem Antigen; Waschschrift zwischen Serum- und Antigeninkubation

**(B) IgM-IC-ELISA.** Simultane Zugabe von Serum und HRP-markiertem Antigen; kein Waschschrift zwischen Serum- und Antigeninkubation (gleichzeitige Inkubation)

Mit den Ergebnissen aus den durchgeführten ELISAs konnte die IgM-Bindung an die Ig-Domäne des Fc $\mu$ R charakterisiert werden. Bei diesen ELISA-Versuchen wurde das in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende HRP-markierte Nukleoprotein des CCHFV (Publikation in Bearbeitung, persönliche Mitteilung Dr. Deschermeier) als Antigen eingesetzt. Das CCHFV-NP ist das Hauptantigen der Bunyaviren und enthält viele virus-spezifische Epitope, weshalb es als Antigen ausgewählt wurde.

Für diesen Versuch wurde je ein anti-CCHFV IgM positives und negatives Serum verwendet. Bei dem IgM-IC-ELISA werden Serum und Antigen gleichzeitig auf der Platte inkubiert, wodurch spezifische IgM/Antigen-Immunkomplexe gebildet werden können. Dabei zeigte sich, dass die Immunkomplexe durch His-Fc $\mu$ R-Ig gebunden werden können (Abb. 19A). Bei der sukzessiven Zugabe von Serum und Antigen im  $\mu$ -Capture-ELISA können keine Immunkomplexe gebildet werden. Dadurch können die anti-

CCHFV IgM-Ak nicht an His-Fc $\mu$ R-Ig binden, wodurch kein positives Signal generiert wird (Abb. 19B). Auf der anti-human IgM Kontrollbeschichtung konnte hingegen die positive Probe detektiert werden.



**Abbildung 19: His-Fc $\mu$ R-Ig bindet IgM-Antikörper nur in Immunkomplexform.**

**(A) Simultane Serum und Antigen Inkubation. IgM-IC-ELISA:** Plattenbeschichtung: His-Fc $\mu$ R-Ig (8  $\mu$ g/ml, dunkelgrau), anti-human IgM (4  $\mu$ g/ml, grau); Serumverdünnung 1:50 (final); Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:8000 (final); IC-Inkubation: 4 h, 4° C; Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; Auftragung der Extinktionswerte für eine anti-CCHFV IgM positiven [+ IgM] und negativen Probe [-IgM]; Fehlerbalken: Standardabweichung n=3

**(B) Sukzessive Serum und Antigen Inkubation.  $\mu$ -Capture-ELISA:** Plattenbeschichtung: His-Fc $\mu$ R-Ig (8  $\mu$ g/ml, dunkelgrau), anti-human IgM (4  $\mu$ g/ml, grau); Serumverdünnung 1:100; Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:8000; Inkubation mit Serum: 4 h, 4° C; Inkubation mit Antigen: 1 h, RT; Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; Auftragung der Extinktionswerte für eine anti-CCHFV IgM positiven [+ IgM] und negativen Probe [-IgM]; Fehlerbalken: Standardabweichung n=3

Diese Resultate zeigen, dass die Rezeptordomäne des Fc $\mu$ R die IgM-Antikörper nur in Form von Immunkomplexen binden kann.

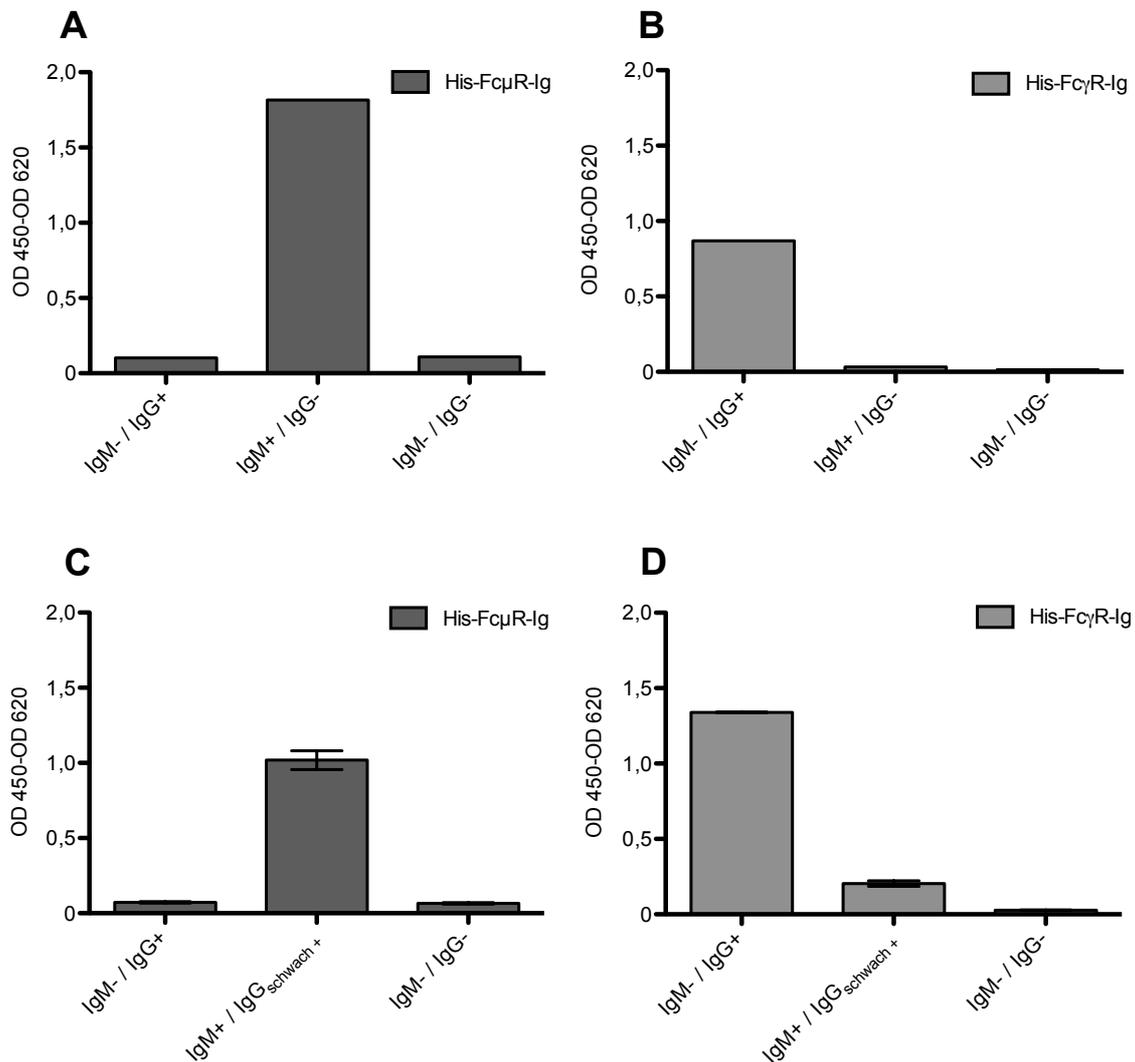
### 3.2.2.2 Keine unspezifische Bindung von IgG/Antigen-

#### Immunkomplexen in humanen und tierischen Serumproben

Der Fc $\mu$ -Rezeptor ist ein spezifischer Rezeptor für die Bindung von IgM-Antikörpern [75]. Um den Einfluss von IgG-Antikörpern auf die IgM-Rezeptorbindung zu untersuchen, wurden humane und tierische Serumproben mit definierten anti-CCHFV IgM/IgG Antikörperkonzentrationen im IC-ELISA analysiert. Als Kontrolle wurde eine His-Fc $\gamma$ R-Ig Beschichtung (5  $\mu$ g/ml) verwendet. Die Rezeptordomäne des CD32-Rezeptors (His-Fc $\gamma$ R-Ig) bindet spezifische IgG-Antikörper in Form von IgG/Antigen-Immunkomplexen [85].

Bei der Analyse der humanen Serumproben mit und ohne anti-CCHFV IgM wird deutlich, dass die Rezeptordomäne des Fc $\mu$ R nur IgM-Immunkomplexe bindet und keine IgG-Immunkomplexe, vice versa für die Rezeptordomäne des CD32-Rezeptors (Abb. 20A-B).

Zusätzlich wurden anti-CCHFV IgM positive und negative Proben tierischen Ursprungs untersucht, es wurden die gleichen Ergebnisse beobachtet (Abb. 20C-D).



**Abbildung 20: Die Immunglobulin-ähnliche Rezeptordomäne des FcμR bindet spezifisch IgM/ Antigen-Immunkomplexe humanen und tierischen Ursprungs und keine IgG/Antigen-Immunkomplexe.**

**(A, B) IC-ELISA mit humanen Serumproben.** Auftragung der Extinktionswerte von einer humanen anti-CCHFV IgM negativen und anti-CCHFV IgG positiven Probe [IgM-/IgG+], einer humanen anti-CCHFV IgM positiven und anti-CCHFV IgG negativen Probe [IgM+/IgG-] und einer humanen anti-CCHFV IgM und IgG negativen Probe [IgM-/IgG-];

IgM-IC-ELISA (A): Plattenbeschichtung: His-FcμR-Ig (8 μg/ml); Serumverdünnung 1:50 (final); Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:8000 (final); IC-Inkubation: 4 h, 4° C; Reaktionsentwicklung: 20 min TMB;

IgG-IC-ELISA (B): Plattenbeschichtung: His-FcγR-Ig (5 μg/ml); Serumverdünnung 1:200 (final); Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:250.000 (final); IC-Inkubation: 24 h, 4° C; Reaktionsentwicklung: 20 min TMB

**(C,D) IC-ELISA mit tierischen Serumproben.** Auftragung der Extinktionswerte von einer tierischen (Zeburind, Afrika) anti-CCHFV IgM negativen und anti-CCHFV IgG positiven Probe [IgM-/IgG+], einer tierischen (Zeburind, Afrika) anti-CCHFV IgM positiven und anti-CCHFV IgG schwach positiven Probe [IgM+/IgG<sub>schwach+</sub>] und einer tierischen (Zeburind, Afrika) anti-CCHFV IgM und IgG negativen Probe [IgM-/IgG-];

IgM-IC-ELISA (C): Plattenbeschichtung: His-FcμR-Ig (8 μg/ml); Serumverdünnung 1:100 (final); Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:150.000 (final); IC-Inkubation: 24 h, 4° C; Reaktionsentwicklung: 10 min TMB; Fehlerbalken: Standardabweichung n=3

IgG-IC-ELISA (D): Plattenbeschichtung: His-FcγR-Ig (5 μg/ml); Serumverdünnung 1:200 (final); Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:250.000 (final); IC-Inkubation: 24 h, 4° C; Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; Fehlerbalken: Standardabweichung n=3

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass His-Fc $\mu$ R-Ig nur IgM-Antikörper in Form von Immunkomplexen bindet und IgG/Antigen-Immunkomplexe nicht gebunden werden können. Dieses gilt im gleichen Maße für humane und tierische Serumproben.

### 3.3 IgM-Immunkomplex ELISA

#### 3.3.1 IgM-IC ELISA zur Detektion von akuten Flavivirus-Infektionen

Zu Beginn wurden Antigene für die Entwicklung eines West-Nil-Virus (WNV) IgM-IC-ELISA rekombinant hergestellt (Kapitel 3.3.1.1). Die wichtigsten Ergebnisse zum WNV-IgM-IC-ELISA wurden im Kapitel 3.3.1.2 herausgearbeitet. Durch das epidemisch auftretende Zika-Virus (ZIKV) in Lateinamerika 2015 wurde der Fokus bei der weiteren Entwicklung des IgM-IC-ELISA auf die Detektion von ZIKV-Infektionen gelegt. Hierfür wurde zunächst das Nicht-Strukturprotein 1 des ZIKV für die Verwendung als Antigen rekombinant hergestellt (Kapitel 3.3.1.3). Der Test wurde validiert (Kapitel 3.3.1.4, 3.3.1.5, 3.3.1.7) und die Infektionsverläufe ZIKV-infizierten Patienten aus Brasilien analysiert (Kapitel 3.3.1.6).

##### 3.3.1.1 Herstellung HRP-markierter WNV-ED3/HRP und WNV-EP/HRP

###### Antigene

Für die Entwicklung eines IgM-IC-ELISA zur anti-West-Nil-Virus (WNV) IgM-Antikörperdetektion wurden zwei Antigene basierend auf dem E-Protein des Virus verwendet. Das E-Protein des WNV ist in der Lipidhülle des Virus eingelagert. Durch die humorale Immunantwort des Menschen werden Antikörper gegen das Protein gebildet, dadurch wird es häufig als Antigen in der Diagnostik eingesetzt [98, 99]. Das gesamte E-Protein des WNV sowie die ED3-Domäne des WNV-E-Proteins wurden als Antigene im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellt.

Das Expressionsplasmid *pJC45-His<sub>10</sub>-3C-WNV-ED3* (Abb. 21A) wurde bereits 2012 innerhalb der Arbeitsgruppe kloniert und *in pAPlacI BL21 E.coli* Zellen transformiert. Die Proteinbiosynthese bei 18 °C wurde durch den Vergleich von Zellkulturproben vor und nach Induktion nachgewiesen.

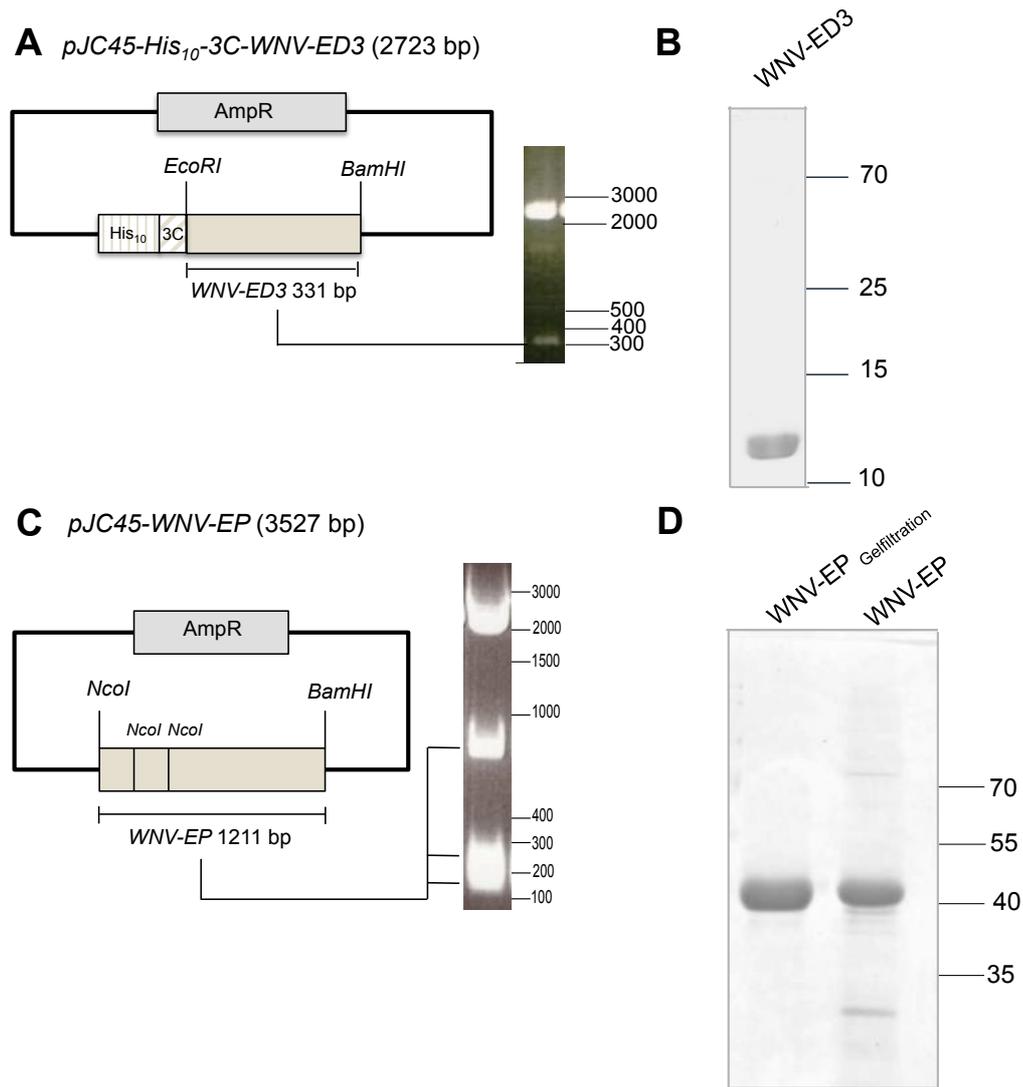
Nach dem Zellaufschluss wurden die löslichen Zellbestandteile von den unlöslichen getrennt. His-WNV-ED3 konnte in der unlöslichen Fraktion mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. Nach Solubilisierung der intrazellulären His-WNV-ED3-Aggregate wurde die Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen zur Reinigung durchgeführt.

Im Durchschnitt konnten aus einer 800 ml Expressionskultur  $18,4 \pm 5,3$  mg (n= 4) denaturiertes His-WNV-ED3 gewonnen werden. Die nachfolgende oxidative Rückfaltung des Proteins ergab nach Konzentrierung  $8,6 \pm 3,8$  mg (n=4) nativ gefaltetes Protein. Dieses wurde, vor der Polyhistidin-Tag Abspaltung, mit der Gelfiltration der Größe

nach getrennt und nur die Proteinfraction mit einem Molekulargewicht um 15 kDa weiter verwendet. Durch den folgenden 3C-Proteaseverdau konnte das His<sub>10</sub>-Tag ( $\approx 1,7$  kDa) vollständig vom WNV-ED3 (12 kDa) abgetrennt werden.

Aus einer 800 ml Expressionskultur konnte mit dieser Aufreinigungsmethode 500-600  $\mu$ g pures WNV-ED3 (Abb. 21B) gewonnen werden.

Das WNV-ED3/HRP wurde als Alternative zum gesamten WNV-E-Protein hergestellt. Die Herstellung des WNV-EP/HRP (Abb. 21C,D) wurde bereits in der Masterarbeit „Entwicklung eines serologischen Tests zur Detektion von IgM-Antikörpern gegen das West-Nil-Virus“ 2014 [87] beschrieben. Die Aufreinigung wurde im Rahmen der Promotionsarbeit weiter optimiert (Integration weiterer Reinigungsschritte: Gelfiltration). Dadurch wies das verwendete WNV-EP/HRP Antigen einen erhöhten Reinheitsgrad im Vergleich zu dem in der Masterarbeit aufgereinigten Protein auf.



**Abbildung 21: WNV-ED3 und WNV-EP**

**(A) Schematische Darstellung des *pJC45-His<sub>10</sub>-3C-WNV-ED3* Expressionsplasmids.** Die DNA-Sequenz des *WNV-ED3* wurde mit den Oligonukleotiden #38 und #39 in den zuvor mit *EcoRI/BamHI* linearisierten Vektor *pJC45-His<sub>10</sub>-3C* kloniert. Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz (AmpR), ein Polyhistidin-Tag (*His<sub>10</sub>*) zur Proteinreinigung und eine 3C-Proteaseschnittstelle (3C) zur Abspaltung des His-Tags.

**(B) WNV-ED3.** Die Reinheit des WNV-ED3 (12 kDa) wurde nach der Polyhistidin-Tag Abspaltung und Reinigung im Polyacrylamidgel untersucht. Die Gelproben wurden nach dem Lauf in einem 20 %-igem Gel und Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blau analysiert.

**(C) Schematische Darstellung des *pJC45-WNV-EP* Expressionsplasmids.** Die DNA-Sequenz des *WNV-EP* wurde mit den Primern #124 und #125 amplifiziert und nach vorangegangener Linearisierung des Vektors *pJC45* mit *NcoI/BamHI* in diesen über In-Fusion® Klonierung amplifiziert. Zur Selektion besitzt der Vektor eine Ampicillinresistenz (AmpR).

**(D) Auswirkung der zusätzlichen Gelfiltration auf die WNV-EP Reinheit.** Zum Vergleich der Aufreinigungen mit und ohne Gelfiltration wurde der jeweilige Probenlauf in der SDS-PAGE miteinander verglichen. Das Polyacrylamidgel (12 %) wurde mit Coomassie Brilliant Blau Färbelösung angefärbt. Das WNV-EP besitzt ein Molekulargewicht von 43 kDa.

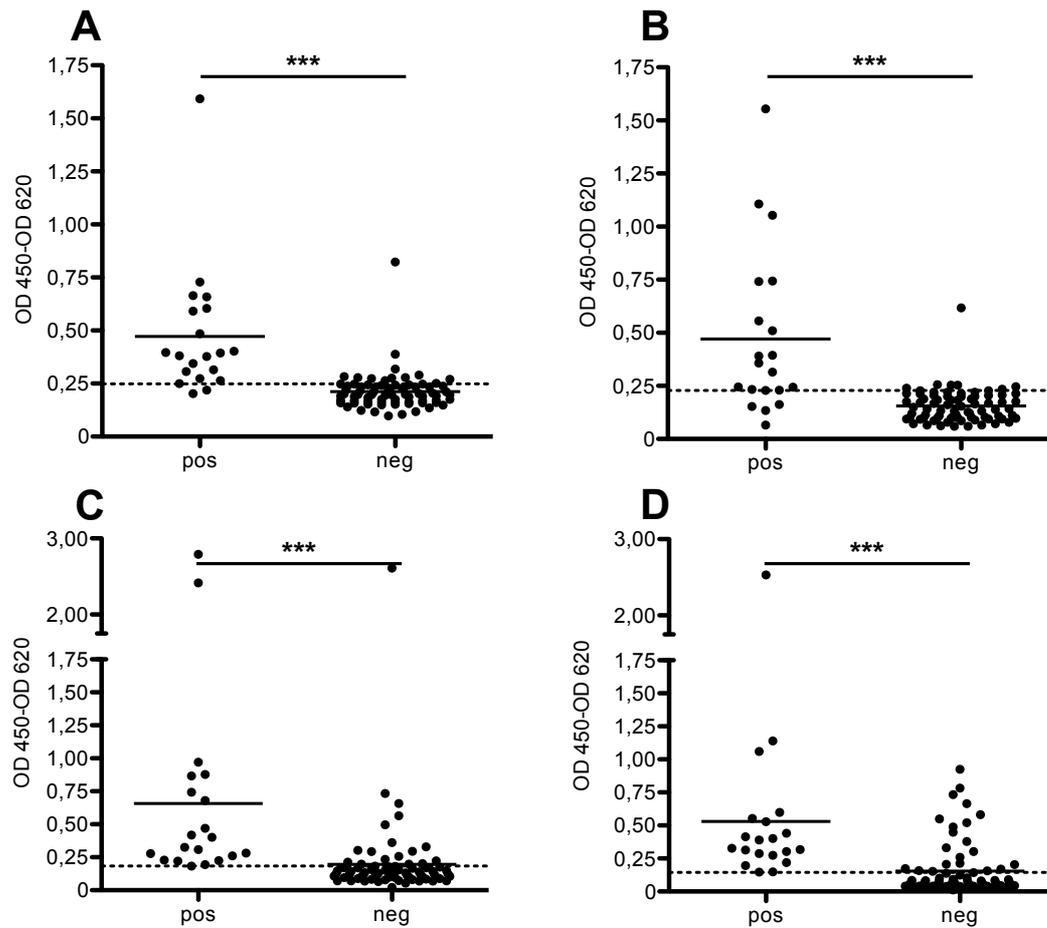
### 3.3.1.2 IgM-IC-ELISA unter Verwendung der rekombinanten WNV-ED3/HRP und WNV-EP/HRP Antigene

Ein Panel, bestehend aus 96 Seren mit 20 anti-WNV IgM positiven (WNV-Immunfluoreszenz bestätigt) und 76 anti-WNV IgM negativen Seren, wurde im IgM-IC-ELISA und einem *in-house*  $\mu$ -Capture-ELISA mit den rekombinant hergestellten WNV-Antigenen vergleichend analysiert. Unter den 76 humanen anti-WNV IgM negativen Seren befanden sich Proben von Patienten mit JEV-/TBEV-/YFV-Impfungen, von Patienten, bei denen eine Flavivirus-Infektion (JEV, TBEV, YFV, ZIKV, DENV) nachgewiesen wurde und gesunden Blutspenderseren. Die im ELISA gemessenen Extinktionswerte wurden für den IgM-IC-ELISA (Abb. 22A, C) und für den  $\mu$ -Capture-ELISA (Abb. 22B, D) grafisch dargestellt.

Mit Hilfe der ROC-Analyse (*Receiver Operating Characteristic*) der MedCalc Software wurde der optimale Cutoff (Werte oberhalb werden als positiv gewertet, Werte unterhalb als negativ) für die ELISA bestimmt. Die ROC-Analyse ist ein statistisches Verfahren, mit dem Untersuchungsverfahren optimiert und verglichen werden können. Hierbei wird der Cutoff, ab dem ein Ergebnis positiv wird, über einen bestimmten Bereich variiert. Dadurch ergeben sich, je nach Wahl des Cutoff's unterschiedliche Sensitivitäts- und Spezifitätswerte. In dieser Arbeit wurde der von der Software vorgeschlagene Cutoff mit der optimalsten Sensitivität und Spezifität ausgewählt.

Durch den statistischen Vergleich der gemessenen Extinktionswerte der anti-WNV IgM positiven und negativen Serumproben wurde für beide ELISA-Systeme, unabhängig vom Antigen, deutlich, dass der Unterschied statistisch signifikant ist.

Mit dem größeren WNV-EP/HRP Antigen wurden in beiden ELISA-Systemen eine bessere Sensitivität als mit dem kleineren WNV-ED3/HRP erreicht (Abb. 22). Die Sensitivität mit dem größeren Antigen betrug in beiden ELISA 100 %. Im Gegensatz dazu ist die Spezifität mit dem kleineren WNV-ED3/HRP in beiden ELISA-Systemen höher. Bei dem größeren Antigen werden vor allem Serumproben mit einer nachweislichen Dengue-Virus-Infektion als falsch positiv detektiert, im  $\mu$ -Capture-ELISA 7 Seren mehr als im IgM-IC-ELISA.



## Zusammenfassung

Antigen		WNV-ED3/HRP		WNV-EP/HRP	
		Anz. positiv IC-ELISA	Anz. positiv $\mu$ -Capture-ELISA	Anz. positiv IC-ELISA	Anz. positiv $\mu$ -Capture-ELISA
Serumproben					
Beschreibung	Anz.				
<b>WNV IgM positiv</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
		<b>Sensitivität 90 %</b>	<b>Sensitivität: 80 %</b>	<b>Sensitivität 100 %</b>	<b>Sensitivität: 100 %</b>
<b>WNV IgM negativ</b>	<b>76</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>18</b>	<b>22</b>
JEV Infektion/Impfung	8	1	1	2	1
TBEV Infektion/Impfung	6	0	0	0	0
YFV Impfung	3	1	0	0	0
ZIKV Infektion	2	1	0	1	0
DENV Infektion	24	2	4	13	20
gesunde Blutspender	33	6	3	2	1
		<b>Spezifität: 86 %</b>	<b>Spezifität: 89 %</b>	<b>Spezifität: 76 %</b>	<b>Spezifität: 71 %</b>

**Abbildung 22: Ergebnis nach Untersuchung eines Serumpanel mit 96 Seren im WNV IgM-IC-ELISA und  $\mu$ -Capture-ELISA.** Darstellung der Extinktionswerte OD450-620 nm. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Student's T-Test* bestimmt (\*\*\*: $p < 0,0001$ ). pos: anti-WNV IgM positive Seren; neg: anti-WNV IgM negative Seren

**(A) IgM-IC-ELISA mit WNV-ED3/HRP.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB+RF/IgG-Absorbent (final), Antigenverdünnung 1:250.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; MedCalc-Cutoff: 0,248 (gestrichelte Linie)

**(B)  $\mu$ -Capture-ELISA mit WNV/ED3/HRP.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung 1:125.000 (final) in CDB, Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; MedCalc-Cutoff: 0,228 (gestrichelte Linie)

**(C) IgM-IC-ELISA mit WNV-EP/HRP.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB+RF (final), Antigenverdünnung 1:50.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; MedCalc-Cutoff: 0,183 (gestrichelte Linie)

**(D)  $\mu$ -Capture ELISA mit WNV-EP/HRP.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung 1:32.000 (final) in CDB, Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; MedCalc-Cutoff : 0,144 (gestrichelte Linie)

Die 20 anti-WNV IgM positiven Proben wurden zum Vergleich mit dem kommerziellen *West Nile Virus IgM Capture DXSelect™* von Focus Diagnostics gemessen (Tab. 9) und alle als positiv detektiert. Eine Auswahl an kreuzreaktiven Proben wurde ebenfalls im Focus ELISA getestet und zeigte falsch-positive Detektionen von DENV- und JEV-infizierten Serumproben.

Tabelle 9: Ergebnisübersicht des West Nile Virus IgM Capture DXSelect™.

Serumproben		Anz. positiv WNV IgM DxSelect™
Beschreibung	Anz.	
<b>WNV IgM positiv</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
		<b>Sensitivität 100 %</b>
<b>WNV IgM negativ</b>	<b>52</b>	<b>6</b>
JEV Infektion/Impfung	8	1
TBEV Infektion/Impfung	6	0
YFV Impfung	3	0
ZIKV Infektion	1	0
DENV Infektion	16	5
gesunde Blutspender	18	0
		<b>Spezifität: 88 %</b>

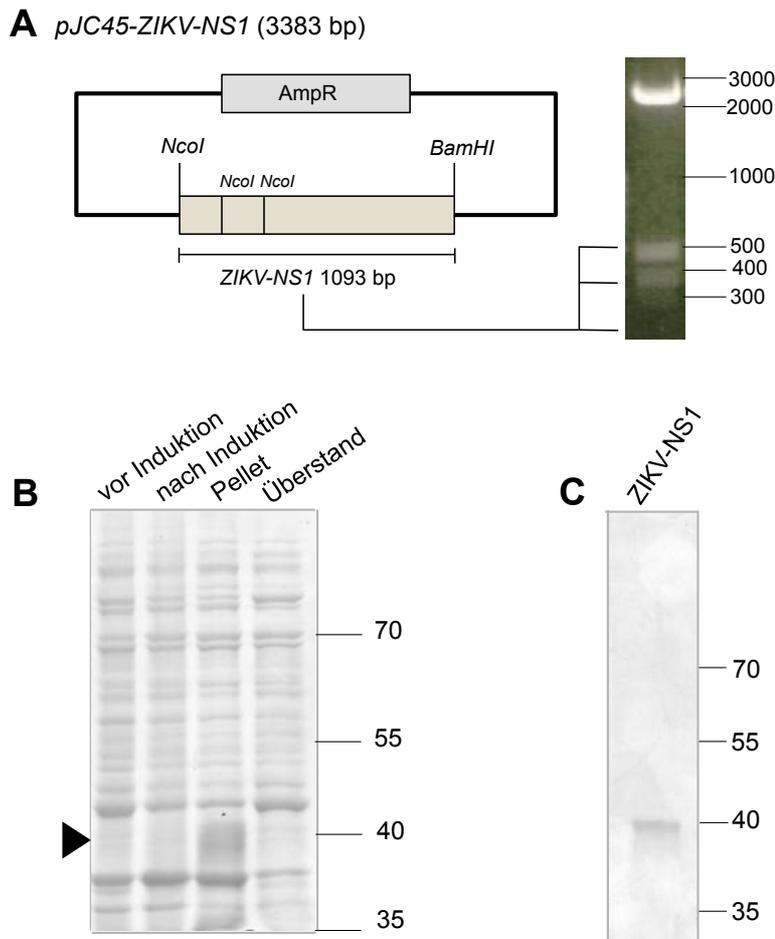
Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass WNV-infizierte Serumproben mit dem IgM-IC-ELISA, unabhängig vom verwendeten Antigen, nachgewiesen werden können und dass eine Differenzierung zwischen anti-WNV IgM positiven und negativen Serumproben deutlicher ist als mit dem *in-house*  $\mu$ -Capture ELISA.

### 3.3.1.3 Herstellung des HRP-markierten ZIKV-NS1 Antigens

Zika-Virus Nicht-Strukturprotein 1 (ZIKV-NS1) wurde im Rahmen dieser Arbeit in Bakterienzellen für die Entwicklung des ZIKV-IgM-IC-ELISA hergestellt.

Das Protein wurde aus den intrazellulären Aggregaten der Bakterienzellen isoliert und anschließend aufgereinigt. Die ZIKV RNA des MR766 Stamms diente als Template zu Generierung von cDNA. Mit Hilfe der Primer #142 und #141 wurde die cDNA, codierend für das gesamte Nicht-Strukturprotein 1 (NS1) des Zika-Virus, amplifiziert und nach Linearisierung des Vektors *pJC45* mit *NcoI/BamHI* in diesen über In-Fusion® Klonierung integriert. Nach Transformation des Expressionsplasmids (Abb. 23A) in die *pAPIacl BL21 E.coli* wurde das Gen nach IPTG-Induktion (final 1 mM) exprimiert und intrazelluläre Aggregate ausgebildet (Abb. 23B). Die intrazellulären Aggregate, auch Einschlusskörper genannt, wurden durch Zellyse und Sonifikation von der löslichen Fraktion des Lysates getrennt und durch Homogenisierung gewaschen. Den Nachweis für die unlösliche Expression des *ZIKV-NS1* erbrachte der Vergleich der Gelauffrennung von unlöslicher Fraktion und löslicher Fraktion (Abb. 23B). Die Aggregate wurden zur Isolation des ungefalteten ZIKV-NS1 solubilisiert.

Die Proteinausbeute betrug 12,5 mg nach Solubilisierung, ausgehend von 3,2 l Expressionskultur. Das Protein wurde anschließend reduziert und oxidativ zurückgefaltet. Nach Rückfaltung und Konzentrierung konnten aus 3,2 l Expressionskultur insgesamt 2,9 mg gefaltetes Protein gewonnen werden. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen, wurde ZIKV-NS1 gelfiltriert. Die erfolgreiche Abtrennung von restlichen *E.coli*-Bestandteilen wurde mittels SDS-PAGE nachgeprüft (Abb. 23C) und das ZIKV-NS1 abschließend HRP-markiert.



**Abbildung 23: ZIKV-NS1: Klonierung, Expression und Reinigung.**

**(A) schematische Darstellung des *pJC45-ZIKV-NS1* Expressionsplasmids.** Die cDNA, codierend für das Nicht-Strukturprotein 1 des Zika-Virus, wurde mit den Oligonukleotiden #142 und #141 amplifiziert und in den linearisierten *pJC45*-Vektor kloniert. Der Vektor besitzt zur Selektion eine Ampicillinresistenz (AmpR).

**(B) Expression.** Die *ZIKV-NS1* cDNA wurde nach 1 mM IPTG-Induktion exprimiert und die Gelbanden der Zellkultur vor und nach Induktion auf einem Polyacrylamidgel (12 %) miteinander verglichen. Der Nachweis der Proteinbiosynthese erfolgte durch den Vergleich der unlöslichen Proteinfraction (Pellet) mit der löslichen (Überstand). ZIKV-NS1 besitzt ein Molekulargewicht von 40 kDa. Das Polyacrylamidgel wurde nach dem Lauf mit einer Coomassie Brilliant Blau Lösung gefärbt.

**(C) ZIKV-NS1 nach Gelfiltration.** ZIKV-NS1 wurde nach erfolgreicher Isolierung aus den *E.coli* Zellen und anschließender Rückfaltung durch die Gelfiltration von Restbestandteilen getrennt und die Probe auf ein 12 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

ZIKV-NS1 konnte innerhalb dieser Arbeit erfolgreich kloniert, exprimiert, rückgefaltet und HRP-markiert werden. Mit der rekombinanten Herstellung in *E.coli* war die Proteinausbeute jedoch aus wirtschaftlicher Hinsicht gering. Die lösliche Proteinexpression in *E.coli* war durch die 6 Disulfidbrücken des Proteins bisher nicht erfolgreich. Deshalb sollte für die zukünftige Herstellung des ZIKV-NS1 ein eukaryotisches Expressionssystem in Betracht gezogen werden, um die native Faltung des Proteins zu ermöglichen.

Das rekombinant hergestellte ZIKV-NS1/HRP wurde als Antigen für die Entwicklung des IgM-IC-ELISA zur Detektion von Zika-Virus infizierten Patientenseren eingesetzt. Diesbezüglich wurden zunächst wichtige, in den EU-Richtlinien der in vitro Diagnostik für kommerzielle Diagnostika (EU-Richtlinie 98/79/EG) beschriebene, einzuhaltende Qualitätsstandards ermittelt. Hierzu gehört unter anderem der Nachweis über Reproduzierbarkeit und Präzision eines Testes, sowie die Bestimmung von Sensitivität und Spezifität.

#### **3.3.1.4 Inter- und Intra-Assay Variation**

Um die Reproduzierbarkeit der ZIKV-IgM-IC-ELISA Ergebnisse nachzuweisen, wurden die Inter- und Intra-Assay Variationen des ELISA mit 5 Serumproben (2 anti-ZIKV IgM positive Seren, 3 anti-ZIKV IgM negative Seren) ermittelt. Die Bestimmung der Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizienten (CV, [%]) ermöglichte eine Einschätzung der ELISA-Genauigkeit und damit der Vertrauenswürdigkeit der ermittelten Ergebnisse.

Die Extinktionswerte (450 nm-620 nm) der 5 Serumproben wurden in Doppelbestimmung an drei Messtagen ermittelt und der CV (Standardabweichung der Extinktionswerte/Mittelwert der Extinktionswerte\*100) berechnet.

Der Intra-Assay Variationskoeffizient gibt die Variation paralleler Doppelbestimmungen an und liegt für den ZIKV-IgM-IC-ELISA unterhalb von 5 % (Abb. 24A).

Der Inter-Assay Variationskoeffizient gibt die Variation der ELISA-Ergebnisse zwischen verschiedenen Messtagen an und liegt beim dem ZIKV-IgM-IC-ELISA unter 10 % (Abb. 24B). Dies lässt auf eine Reproduzierbarkeit der im ZIKV-IgM-IC-ELISA ermittelten Ergebnisse schließen.

**A Intra-Assay Variation**

Probe	Tag 1			Tag 2			Tag 3			$CV_{intra,M}$
	$M$	$SD$	$CV_{intra}$	$M$	$SD$	$CV_{intra}$	$M$	$SD$	$CV_{intra}$	
pos1	0,544	0,004	0,7	0,538	0,007	1,3	0,547	0,029	5,3	2,4
pos2	0,242	0,019	7,9	0,269	0,001	0,4	0,261	0,006	2,3	3,5
										<b>2,95</b>
neg1	0,045	0	0	0,052	0,002	3,8	0,052	0,009	17,3	7,0
neg2	0,045	0	0	0,058	0,003	5,2	0,044	0,001	2,3	2,5
neg3	0,063	0,005	7,9	0,067	0	0	0,06	0,004	6,7	4,9
										<b>4,8</b>

**B Inter-Assay Variation**

Probe	$M_{M\ Tag1-3}$	$SD_{M\ Tag1-3}$	$CV_{inter}$
pos1	0,543	0,005	0,84
pos2	0,257	0,014	5,39
			<b>3,1</b>
neg1	0,050	0,004	8,1
neg2	0,049	0,008	15,9
neg3	0,063	0,004	5,5
			<b>9,8</b>

**Abbildung 24: Intra- und Inter-Assay Variation des ZIKV-IgM-IC-ELISA.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung ZIKV-NS1/HRP 1:50.000 (final) in CDB/PEG4000, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB

**(A) Intra-Assay Variation.** 2 anti-ZIKV IgM positive und 3 anti-ZIKV IgM negativen Seren wurden in Doppelbestimmung im ZIKV-IgM-IC-ELISA gemessen und die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Der  $CV_{intra}$  ergibt sich aus der Division der Standardabweichung der Extinktionswerte durch den Mittelwert der Extinktionswerte \*100.  $CV_{intra,M}$  ist der Mittelwert der  $CV_{intra}$  der einzelnen ELISA. Fett unterlegt ist der Mittelwert aus den einzelnen  $CV_{intra,M}$ .

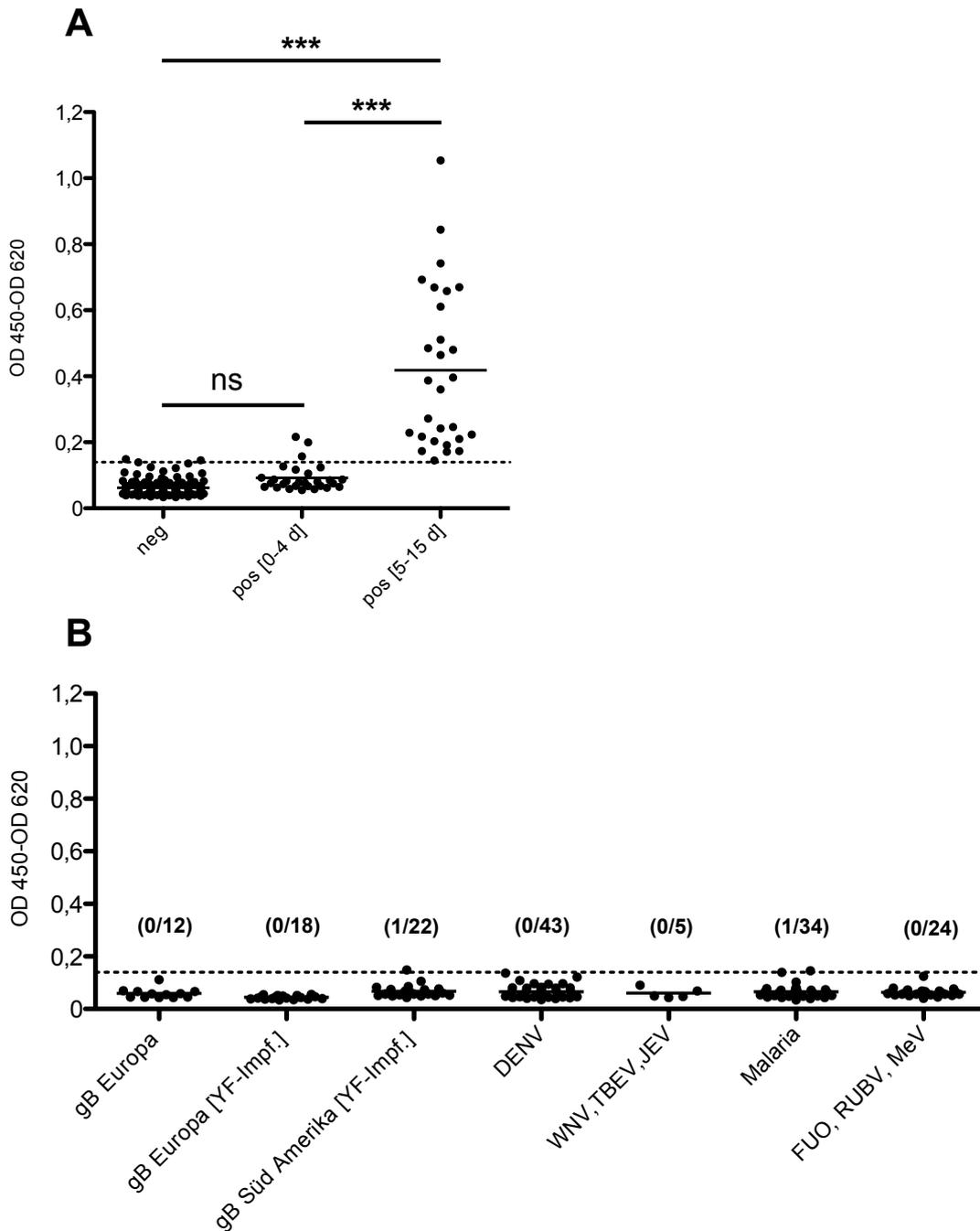
**(B) Inter-Assay Variation.** Die Inter-Assay Variation ergibt sich aus der Division des Mittelwertes der Standardabweichung der Extinktionswerte von Tag 1-3 durch den Mittelwert der Extinktionswerte von Tag 1-3. Fett unterlegt ist der Mittelwert aus den einzelnen  $CV_{inter}$ .

**3.3.1.5 Sensitivität und Spezifität**

Mit dem ZIKV-IgM-IC-ELISA wurde unter Verwendung des ZIKV-NS1/HRP Antigens ein Panel mit Seren von 28 PCR bestätigten ZIKV infizierten Patienten mit je einer frühen Serumprobe (0-4 Tage nach den ersten Symptomen) und einer späten Serumprobe (5-15 Tage nach den ersten Symptomen) sowie 158 anti-ZIKV IgM negativen Seren gemessen. Anhand des Serumpanels wurde die Sensitivität und Spezifität des ZIKV-IgM-IC-ELISA ermittelt.

Die gemessenen Extinktionswerte wurden grafisch dargestellt (Abb. 25A). Der Unterschied der Extinktionswerte zwischen den späten Serumproben der ZIKV-PCR bestätigten Infektionen und den anti-ZIKV IgM negativen Proben ist statistisch signifikant (\*\*\*:  $p < 0,0001$ ). Ebenso ist der Unterschied der Extinktionswerte zwischen den frühen und späten Proben der ZIKV infizierten Patienten statistisch signifikant (\*\*\*:  $p < 0,0001$ ). Alle späten Serumproben der ZIKV infizierten Patienten liegen oberhalb des Cutoff's (durch MedCalc Software ermittelt anhand einer ROC-Analyse; bestimmt den optima-

len Cutoff bei maximal möglicher Sensitivität und Spezifität des ELISA). Der ZIKV IgM-IC-ELISA besitzt demzufolge eine 100 %-ige Sensitivität ab dem 5. Tag nach Auftreten erster Symptome. Zwischen den gemessenen negativen Proben und den frühen Serumproben der ZIKV infizierten Patienten besteht kein signifikanter Unterschied. Bei der Betrachtung der 158 anti-ZIKV IgM negativen Proben ist zu erkennen, dass 2 von 158 Seren um den Cutoff (gestrichelte Linie) liegen, somit beträgt die Spezifität des Testes 99 % (Abb. 25B).



**Abbildung 25: Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des ZIKV-IgM-IC-ELISA.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung ZIKV-NS1/HRP 1:50.000 (final) in CDB/PEG4000, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB; MedCalc-Cutoff : 0,1395 (gestrichelte Linie)

**(A) Extinktionswerte der 214 Serumproben. Sensitivität.** Die statistische Signifikanz wurde mit dem *One-way Anova Test* und *Bonferroni Test* in der Prism Software ermittelt (\*\*\*: $p < 0,0001$ ). neg: 158 anti-ZIKV IgM negative Seren. pos [0-4 d]: 28 ZIKV-PCR bestätigte Serumprobe, Tag 0-4 nach Auftreten der Symptome. pos [5-15 d]: 28 *Follow-up* Proben, Tag 5-15 nach Auftreten der Symptome.

**(B) Spezifität.** Die Extinktionswerte der 158 anti-ZIKV IgM negativen Serumproben aus A wurden detaillierter dargestellt und die positiv detektierten Proben in Zahlenwerten gekennzeichnet.

gB: gesunde Blutspenderseren; DENV: Patientenproben mit primäre und sekundären DENV-Infektionen; Malaria: Patientenproben mit einer akuten Malariainfektion (23 *P. falciparum*, 11 *P. malariae*); WNV, TBEV, JEV: 2 Patientenproben mit WNV-Infektion, 1 Patientenprobe mit TBEV-Infektion, 2 Patientenproben mit JEV-Infektion; FUO, RUBV, MeV: 12 Patientenproben mit Fieber unbekannter Herkunft (FUO), je 6 Patientenproben mit RUBV/MeV-Infektionen

Durch die Bestimmung der Sensitivität (100 %) und Spezifität (99 %) des ZIKV-IgM-IC-ELISA konnte gezeigt werden, dass der ELISA die Qualität besitzt, eine akute ZIKV-Infektion zu erkennen. Nach Ermittlung der grundsätzlichen Eigenschaften des Testsystems (Reproduzierbarkeit, Sicherheit der Testergebnisse) konnten die Seren der 28 Virus infizierten Patienten genauer analysiert werden.

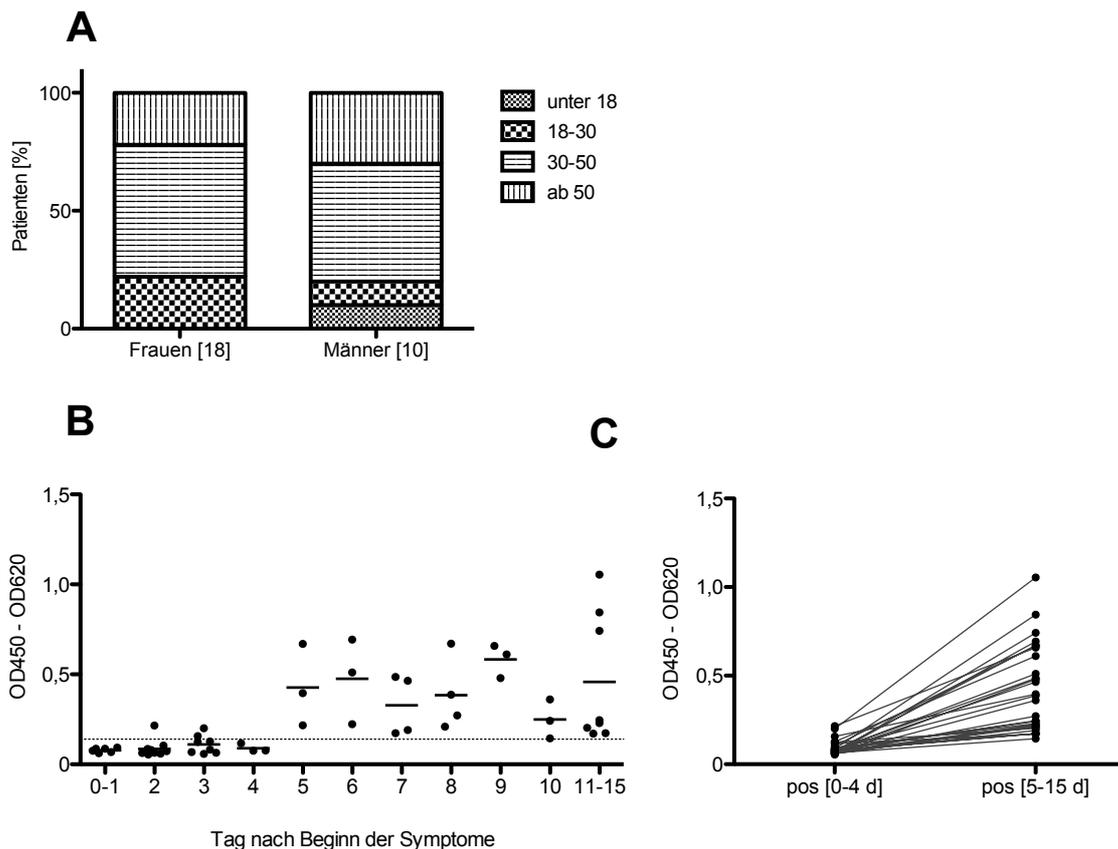
### **3.3.1.6 Analyse der Zika-Virus infizierten Patienten aus Brasilien**

Während der Zika-Virus Epidemie 2015 in Brasilien wurden vom Fiocruz Institut in Rio de Janeiro Serumproben von ZIKV infizierten Patienten in der Arbeitsgruppe von Dr. Ana Maria Bispo de Filippis gesammelt und analysiert. Eine ZIKV-Infektion wurde mit Hilfe der PCR-Methode in den frühen Serumproben der Patienten nachgewiesen. 28 Patienten, bei denen eine Zika-Virus-Infektion diagnostiziert wurde, wurden am Fiocruz Institut mit dem ZIKV IgM-IC ELISA analysiert.

Der Frauenanteil der untersuchten Patienten lag bei 64 %. Das Medianalter der weiblichen Patienten betrug 35,5 Jahren (Minimum: 18 Jahre, Maximum: 58 Jahre). Der männliche Anteil der untersuchten Patientengruppe lag bei 36 % mit einem Medianalter von 39 (Minimum: 11 Jahre, Maximum: 58 Jahre) (Abb. 26A). Für jeden Patienten wurde eine frühe Serumprobe, 0-5 Tage nach den ersten Symptomen und eine späte Serumprobe, 5-15 Tage nach den ersten Symptomen, untersucht. Für diese Seren standen keine weiteren klinischen Daten zur Verfügung.

Eine zeitliche Sortierung der 56 Seren nach dem Auftreten der Symptome ergab, dass eine Zika-Virus-Infektion mit dem IgM-IC-ELISA mit dem 5. Tag nach Beginn der Symptome diagnostiziert werden kann (Abb. 26B). Durch die Untersuchung der frühen und späten Serumprobe eines jeden Patienten (Abb. 26C) konnte für jeden Patienten ein IgM-Titer Anstieg beobachtet werden.

Die Division des Extinktionswertes der späten Probe mit dem der frühen Probe gibt den Grad der Serokonversion, d.h. die Entwicklung von Antikörpern an. Bei bis auf 2 ZIKV-PCR bestätigten Patienten konnte mindestens eine Verdopplung des Extinktionswertes von der frühen zur späteren Serumprobe beobachtet werden.



**Abbildung 26: Analyse der ZIKV diagnostizierten Patientenserum.**

**(A) Gender und Alter.** Die 28 Patienten wurden nach Geschlecht und Alter unterteilt und die Verteilung prozentual dargestellt.

**(B) Serologische Detektion einer ZIKV-Infektion ab dem 5.Tag nach Beginn der Symptome.** Die 56 Extinktionswerte der frühen und späten Serumprobe der 28 Patienten wurden zeitlich sortiert aufgetragen. ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung ZIKV-NS1/HRP 1:50.000 (final) in CDB/PEG4000, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB; MedCalc-Cutoff : 0,1395 (gestrichelte Linie)

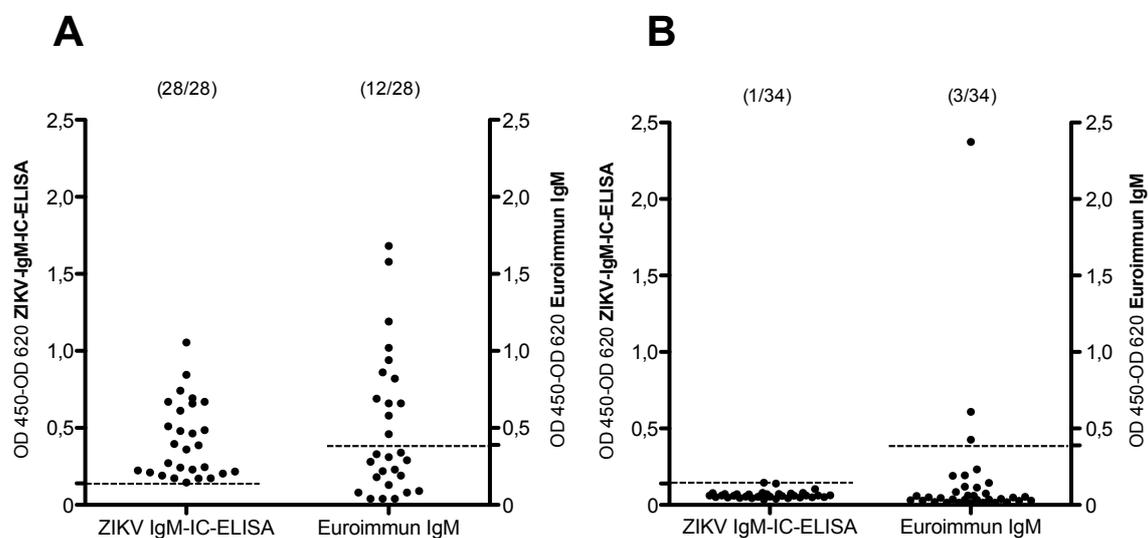
**(C) Serokonversion.** Die Extinktionswerte der frühen und späten Serumprobe (Durchführung ELISA, siehe B) wurden zusammenhängend dargestellt.

### 3.3.1.7 Vergleich des ZIKV-IgM-IC-ELISA mit dem anti-Zika-Virus IgM-ELISA von Euroimmun

Mit den Ergebnissen aus dem Kapitel 3.3.1.5 konnte gezeigt werden, dass der ZIKV IgM-IC-ELISA funktioniert und eine hohe Sensitivität von 100 % (ab dem 5. Tag nach Auftreten der Symptome) und eine hohe Spezifität von 99 % aufweist. Um den neu entwickelten IgM-IC-ELISA mit einem kommerziellen Testkit zu vergleichen, wurden die 28 anti-ZIKV IgM Serumproben (ab Tag 5 nach Auftreten der Symptome) im anti-Zika-Virus IgM-ELISA der Firma Euroimmun getestet und nach Herstellerangaben ausgewertet.

Bei dem Euroimmun ELISA binden anti-ZIKV IgM Antikörper an eine ZIKV-NS1 beschichtete Oberfläche, eine Virusinfektion wird nach dem Prinzip des indirekten ELISA nachgewiesen. Im Vergleich zum IgM-IC-ELISA detektierte der kommerzielle Test nur 12 von 28 Seren als positiv, dies entspricht einer Sensitivität von 43 % (Abb. 27A). Bei

dem Vergleich wird deutlich, dass der Cutoff des Euroimmun Kits mit 0,389 wesentlich höher liegt als bei dem ZIKV-IgM-IC-ELISA mit einem Cutoff von 0,1395 (MedCalc Software). In dem hoch angesetzten Cutoff des Euroimmun Kits liegt die Ursache für die geringe Sensitivität des kommerziellen Kits. Nach der Untersuchung von 34 Patientenseren mit einer akuten Malariainfektion (23 *P. falciparum*, 11 *P. malariae*) wird die Notwendigkeit des hohen Cutoff des kommerziellen Kits deutlich (Abb. 27B). 3 der 23 *P. falciparum* infizierten Seren wurden mit dem Euroimmun ELISA falsch positiv detektiert, mit dem IgM-IC-ELISA lag ein Serum um den Cutoff. Eine Senkung des Cutoffs im kommerziellen ELISA würde demnach die Sensitivität erhöhen, jedoch zu einem Spezifitätsverlust, vor allem bei Malaria infizierten Serumproben führen. Der ZIKV-IgM-IC-ELISA hat dieses Problem nicht.



**Abbildung 27: Vergleich des ZIKV-IgM-IC-ELISA mit einem kommerziellen anti-Zika IgM-ELISA von Euroimmun.**  
**(A) Vergleich der Extinktionswerte von 28 anti-ZIKV IgM positiven Serumproben (Tag 5 nach ersten Symptomen).** IgM-IC-ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung ZIKV-NS1/HRP 1:50.000 (final) in CDB/PEG4000, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB; MedCalc-Cutoff (linke y-Achse): 0,1395 (gestrichelte Linie); anti-Zika IgM-ELISA von Euroimmun: indirekter ELISA; nach Herstellerangaben durchgeführt; Cutoff (rechte y-Achse): 0,389 (gestrichelte Linie)  
**(B) Vergleich der Extinktionswerte von 34 Malaria-infizierten Patientenseren.** Die ELISA wurden wie in A beschrieben durchgeführt und die Extinktionswerte grafisch dargestellt. MedCalc-Cutoff IgM-IC-ELISA (linke y-Achse): 0,1395 (gestrichelte Linie); Cutoff Euroimmun (rechte y-Achse): 0,389 (gestrichelte Linie)

Die Messung der 158 anti-ZIKV IgM negativen Seren im anti-ZIKV IgM ELISA von Euroimmun ergab eine Spezifität von 97 % (153/158 negativ). Zu den 5 falsch-positiv detektierten Seren gehörten die 3 Malariainfektionen und je ein Serum mit einer RUBV-/MeV-Infektion.

### 3.3.2 IgM-IC-ELISA zur Detektion von akuten CCHFV-Infektionen

Zur Entwicklung des CCHFV-IgM-IC-ELISA wurde das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Antigen CCHFV-NP/HRP verwendet. Das Nukleoprotein des CCHFV besitzt mehrere virusspezifische Epitope, aufgrund derer es als Antigen in diagnostischen Test eingesetzt wird [100]. In erster Linie wurde der CCHFV-IgM-IC-ELISA im Rahmen dieser Arbeit validiert. Es wurde die Reproduzierbarkeit, die Präzision, der Einfluss von Störfaktoren und die Sensitivität/Spezifität analysiert. Des Weiteren wurden CCHFV-infizierte Serumproben anhand der Ergebnisse des IgM-IC-ELISA charakterisiert. Abschließend wurde der neu entwickelte CCHFV-IgM-IC-ELISA mit einem *in-house*  $\mu$ -Capture ELISA verglichen.

#### 3.3.2.1 Inter- und Intra-Assay Variation

Die Inter- und Intra-Assay Variation des CCHFV-IgM-IC-ELISA wurde bestimmt, um die Reproduzierbarkeit und die Messwertstreuung des ELISA einschätzen zu können. Hierfür wurden drei negative Blutspenderseren und drei anti-CCHFV IgM positive Patientenseren (mit unterschiedlicher Signalhöhe im ELISA) in Dreifachbestimmung an drei verschiedenen Tagen gemessen. Die Extinktionswerte wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

Der Variationskoeffizient (CV,%) setzt sich zusammen aus dem Quotienten der Standardabweichung der Extinktionswerte und dem Mittelwert der Extinktionswerte multipliziert mit 100. Die Rohdaten zur Ermittlung der Intra- und Inter-Assay Variation wurden tabellarisch dargestellt (Abb. 28).

Die Intra-Assay Variation gibt die Messwertstreuung einer Probe innerhalb eines ELISA an und wurde aus den Dreifachbestimmungen ermittelt. Diese liegt für den CCHFV-IgM-IC-ELISA unterhalb von 5 % (Abb. 28A).

Die Inter-Assay Variation gibt den Grad der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen einer Probe an und wird durch die Messung an verschiedenen Messtagen bestimmt. Die Inter-Assay Variation liegt bei 5 % (Abb. 28B).

## A Intra-Assay Variation

Probe	Tag 1			Tag 2			Tag 3			$CV_{intra,M}$
	$M$	$SD$	$CV_{intra}$	$M$	$SD$	$CV_{intra}$	$M$	$SD$	$CV_{intra}$	
hoch	1,737	0,025	1,4	1,887	0,107	5,7	1,890	0,054	2,8	3,3
mittel	0,901	0,032	3,6	1,000	0,016	1,6	1,002	0,035	3,5	2,9
schwach	0,499	0,065	13,0	0,541	0,047	8,7	0,539	0,023	4,3	8,7
										<b>4,97</b>
neg1	0,061	0,004	5,9	0,067	0,002	3,0	0,062	0,062	1,9	3,6
neg2	0,065	0,004	6,2	0,064	0,005	7,2	0,060	0,060	1,7	5,0
neg3	0,070	0,005	6,7	0,072	0,003	3,5	0,070	0,070	4,3	4,8
										<b>4,67</b>

## B Inter-Assay Variation

Probe	$M_{M\ Tag1-3}$	$SD_{M\ Tag1-3}$	$CV_{inter}$
hoch	1,838	0,088	4,8
mittel	0,968	0,058	6,0
schwach	0,527	0,024	4,5
			<b>5,1</b>
neg1	0,063	0,003	5,0
neg2	0,063	0,003	4,0
neg3	0,071	0,001	1,8
			<b>3,6</b>

**Abbildung 28: Intra- und Inter-Assay Variation des CCHFV-IgM-IC-ELISA.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:50.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB

**(A) Intra-Assay Variation.** Die Intra-Assay Variation ( $CV_{intra}$ ) setzt sich zusammen aus dem Quotient der Standardabweichung der Extinktionswerte der Dreifachbestimmungen und dem Mittelwert der gleichen Werte multipliziert mit 100. Der Mittelwert der  $CV_{intra}$  der drei ELISA (Tag 1-3) wurde als  $CV_{intra,M}$  bezeichnet.

**(B) Inter-Assay Variation.** Die Inter-Assay-Variation ( $CV_{inter}$ ) gibt die Variation zwischen den Wiederholungen des ELISA an verschiedenen Messtagen an und berechnet sich wie der  $CV_{intra}$ , mit den Werten des Mittelwertes/Standardabweichung der ELISA Ergebnisse an drei verschiedenen Tagen.

Die Variationskoeffizienten des CCHFV-IgM-IC-ELISA liegen unterhalb von 6 % und belegen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des CCHFV-IgM-IC-ELISA.

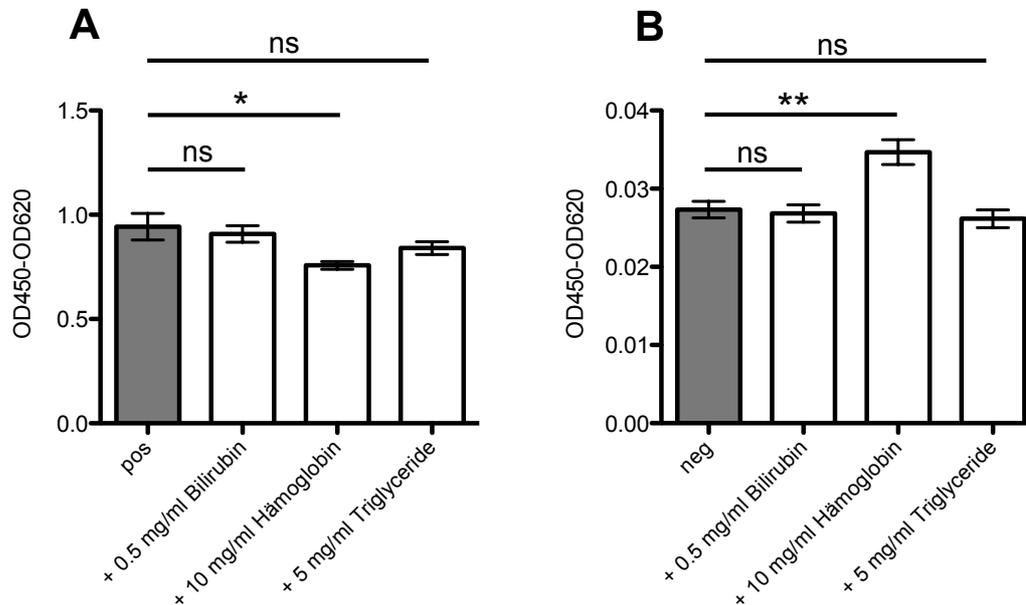
### 3.3.2.2 Einfluss von Störfaktoren auf den IC-ELISA

Hämolyse, Ikterus und Lipämie sind natürliche Prozesse, die in der serologischen Diagnostik zu Abweichungen zwischen dem gemessenen Ergebnis und dem tatsächlichen Wert führen können. Um den Einfluss dieser Vorgänge auf die Ergebnisse des IC-ELISA zu untersuchen, wurde eine anti-CCHFV IgM positive und negative Serumprobe mit je 0,5 mg/ml Bilirubin, 10 mg/ml Hämoglobin und 5 mg/ml Triglyceride (finale Konzentrationen) versetzt und mit der unbehandelten Serumprobe verglichen.

Die getesteten Substanzen sollten die natürlichen Prozesse der Hämolyse (Hämoglobin), Ikterus (Bilirubin) und Lipämie (Triglyceride) simulieren, deshalb wurden hohe Konzentrationen ausgewählt.

Bei dem Vergleich der behandelten mit der unbehandelten Probe (positiv und negativ) konnte nur bei zusätzlichem Hämoglobin ein signifikanter Unterschied beobachtet wer-

den (Abb. 29). Bei genauerer Betrachtung der Extinktionswerte besteht bei der positiven und auch der negativen Probe eine Abweichung zur unbehandelten Serumprobe von 20 %. Die anderen Zusätze zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse des IC-ELISA.



**Abbildung 29: Einfluss von Störfaktoren auf den CCHFV-IgM-IC-ELISA.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:50.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB; frische Zugabe der Störfaktorsubstanzen (Angabe finale Konzentrationen); statistische Signifikanz: One-way Anova Test und Bonferroni Test (Prism Programm), \*:p<0,05, \*\*:p<0,01

**(A) Einfluss von Störfaktoren auf eine anti-CCHFV IgM positive Serumprobe.**

**(B) Einfluss von Störfaktoren auf eine anti-CCHFV IgM negative Serumprobe.**

### 3.3.2.3 Sensitivität und Spezifität

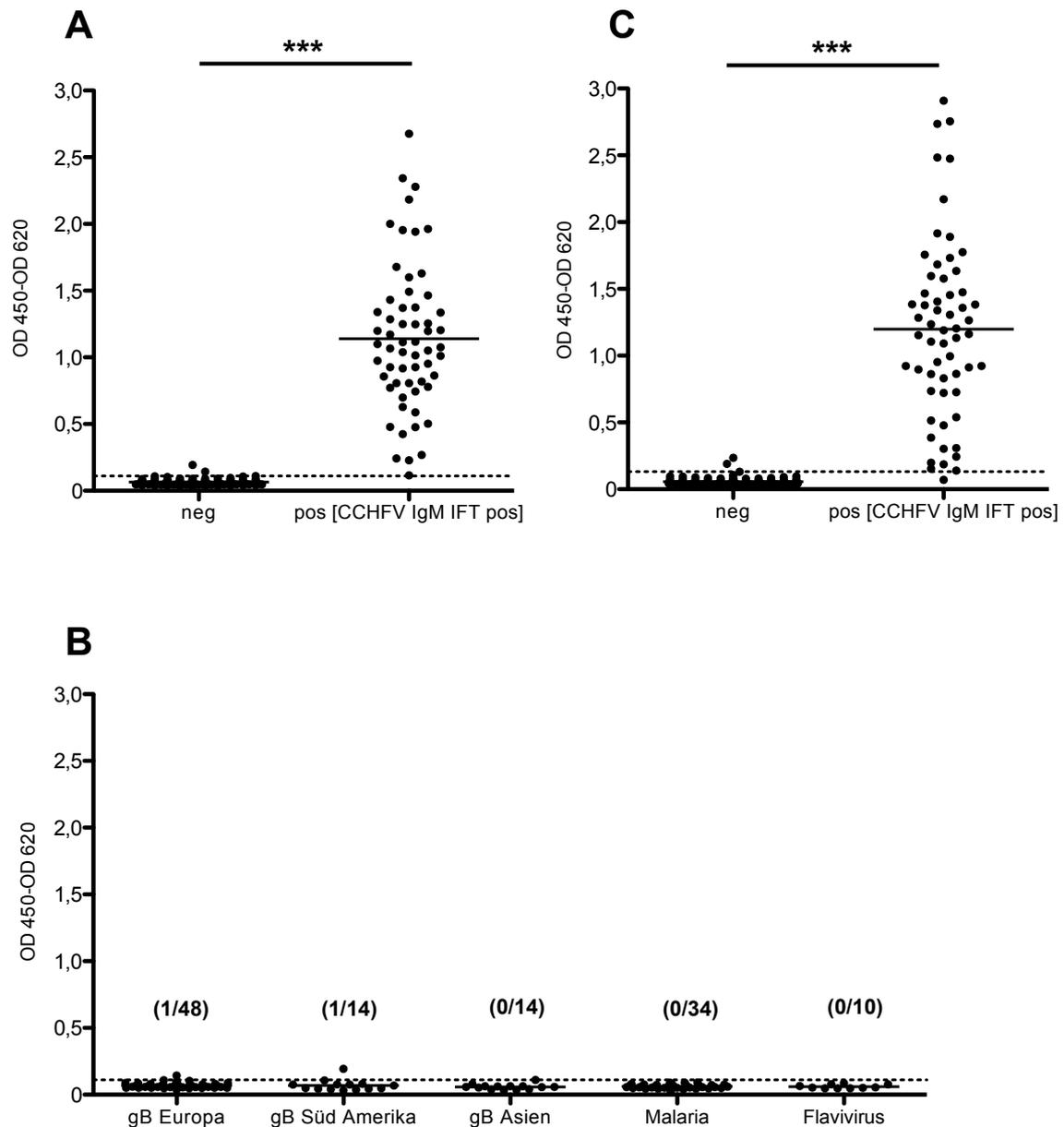
Die Sensitivität und Spezifität des CCHFV-IgM-IC-ELISA wurde mit einem 179 Seren umfassenden Panel ermittelt. Das Serumpanel bestand aus 59 anti-CCHFV IgM positiven Proben (CCHFV-Immunfluoreszenz (IFT) bestätigt, BNITM) und 120 anti-CCHFV IgM negativen Proben. Es wurden nur anti-CCHFV IgM, IFT bestätigte Serumproben zur Sensitivitätsbestimmung ausgewählt, da es sich bei dem IFT um den serologischen Goldstandard handelt.

Die Extinktionswerte (450 nm-620 nm) der gemessenen Serumproben wurden grafisch dargestellt (Abb. 30). Der Cutoff wurde mit der MedCalc Software (ROC-Analyse) ermittelt und mit einer gestrichelten Linie im Diagramm gekennzeichnet. Seren oberhalb des errechneten Cutoff's gelten als positiv, eine CCHFV-Infektion konnte nachgewiesen werden. Seren unterhalb des Cutoff werden negativ gewertet.

Alle 59 anti-CCHFV IgM positiven Proben liegen oberhalb des Cutoff und wurden demnach als positiv detektiert (Abb. 30A). Somit besitzt der CCHFV-IgM-IC-ELISA eine Sensitivität von 100 %.

Die Extinktionswerte der 120 anti-CCHFV IgM negativen Patientenprobe wurden für eine detaillierte Betrachtung in Gruppen unterteilt (Abb. 30B). Dabei zeigte sich, dass zwei gesunde Blutspenderseren etwas über dem Cutoff liegen und somit als falsch positiv detektiert wurden. Rheumafaktor als Ursache für die falsch-positive Detektion der zwei Seren konnte durch ein negatives Ergebnis im *RFslide Kit* (analyticon) ausgeschlossen werden. Der CCHFV-IgM-IC-ELISA besitzt demzufolge eine Spezifität von 98 %.

Bei den bereits beschriebenen Ergebnissen wurde der IC-ELISA für 24 h bei 4 °C inkubiert. Um die Möglichkeit einer Inkubationsverkürzung nachzuweisen, wurde das Serumpanel im IC-ELISA mit einer 4 h-Inkubation bei 4 °C gemessen (Abb. 30C). Die gemessenen Extinktionswerte zeigen im Wesentlichen, bis auf zwei falsch-positiv detektierte anti-CCHFV IgM positive Seren, das Ergebnis der 24 h-Inkubation. Mit der Verkürzung der Inkubation konnte eine Sensitivität und Spezifität von je 98 % erreicht werden.



**Abbildung 30: Sensitivität und Spezifität des CCHFV-IgM-IC-ELISA, ermittelt mit einem 179 großen Serumpanel.**

ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:50.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB

**(A) Sensitivität.** MedCalc-Cutoff: 0,11 (gestrichelten Linie); statistische Signifikanz: *Student's t-Test* (Prism-Programm), \*\*\*:  $p < 0,0001$ ; neg: anti-CCHFV IgM negative Seren; pos: anti-CCHFV IgM positive, IFT bestätigte Seren.

**(B) Spezifität.** Die in A unter negativ zusammengefassten Serumproben wurden in Untergruppen unterteilt und die positivdetektierten Seren angegeben.

gB: gesunde Blutspenderseren; Malaria: Patientenproben mit einer akuten Malariainfektion (23 P. *falciparum*, 11 P. *malariae*); Flavivirus: 8 Patientenproben mit einer primären DENV-Infektion; 2 Patientenproben mit einer TBEV-Infektion

**(C) IgM-IC-ELISA mit 4h-Inkubation.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:50 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:8.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 4 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 20 min TMB; MedCalc-Cutoff: 0,131 (gestrichelten Linie); statistische Signifikanz: *Student's t-Test* (Prism-Programm), \*\*\*:  $p < 0,0001$ ; neg: anti-CCHFV IgM negative Seren; pos: anti-CCHFV IgM positive, IFT bestätigte Seren.

Für den CCHFV IgM-IC-ELISA konnten hohe Sensitivitäts- und Spezifitätswerte bei einer ELISA Inkubation von 24 h und 4 h ermittelt werden. Damit wurde die Grundlage für einen qualitativ hochwertigen diagnostischen Test erfüllt, dies ermöglichte wiederum eine Charakterisierung der in dieser Arbeit zur Testvalidierung eingesetzten CCHFV infizierten Serumproben .

#### **3.3.2.4 Analyse CCHFV infizierter Serumproben (humanen und tierischen Ursprungs)**

Die in Kapitel 3.3.3.3 verwendeten 59 anti-CCHFV IgM (IFT bestätigt) Proben gehören zu einem Serumpanel aus dem Kosovo. Von 2013 bis 2014 hat Frau Dr. Petra Emmerich vom Bernhard-Nocht-Institut im Rahmen einer Kooperation mit der Universität in Pristina „Hasan Prishtina“ Serumproben über einen längeren Zeitraum von 15 CCHFV infizierten Patienten gesammelt und analysiert. Die insgesamt 67 Seren wurden mit Hilfe der RT-PCR (RT-PCR Kit, Altona Diagnostics), einem BNITM *in-house* Immunfluoreszenz Test (IFT) und den IgG/IgM Vector Best Kits diagnostiziert. Bei 59 von 67 Seren wurden mit dem IFT anti-CCHFV IgM-Ak detektiert, bei den verbleibenden 8 CCHFV-PCR positiven Seren nicht. Der CCHFV-IgM-IC-ELISA (24 h) konnte alle 59 Seren als anti-CCHFV IgM positiv identifizieren (Kapitel 3.3.3.3). Zusätzlich konnten von den 8 (IgM CCHFV-IFT negativ, CCHFV-PCR positiven) Seren 2 als anti-CCHFV IgM positiv im CCHFV-IgM-IC-ELISA (24 h) identifiziert werden.

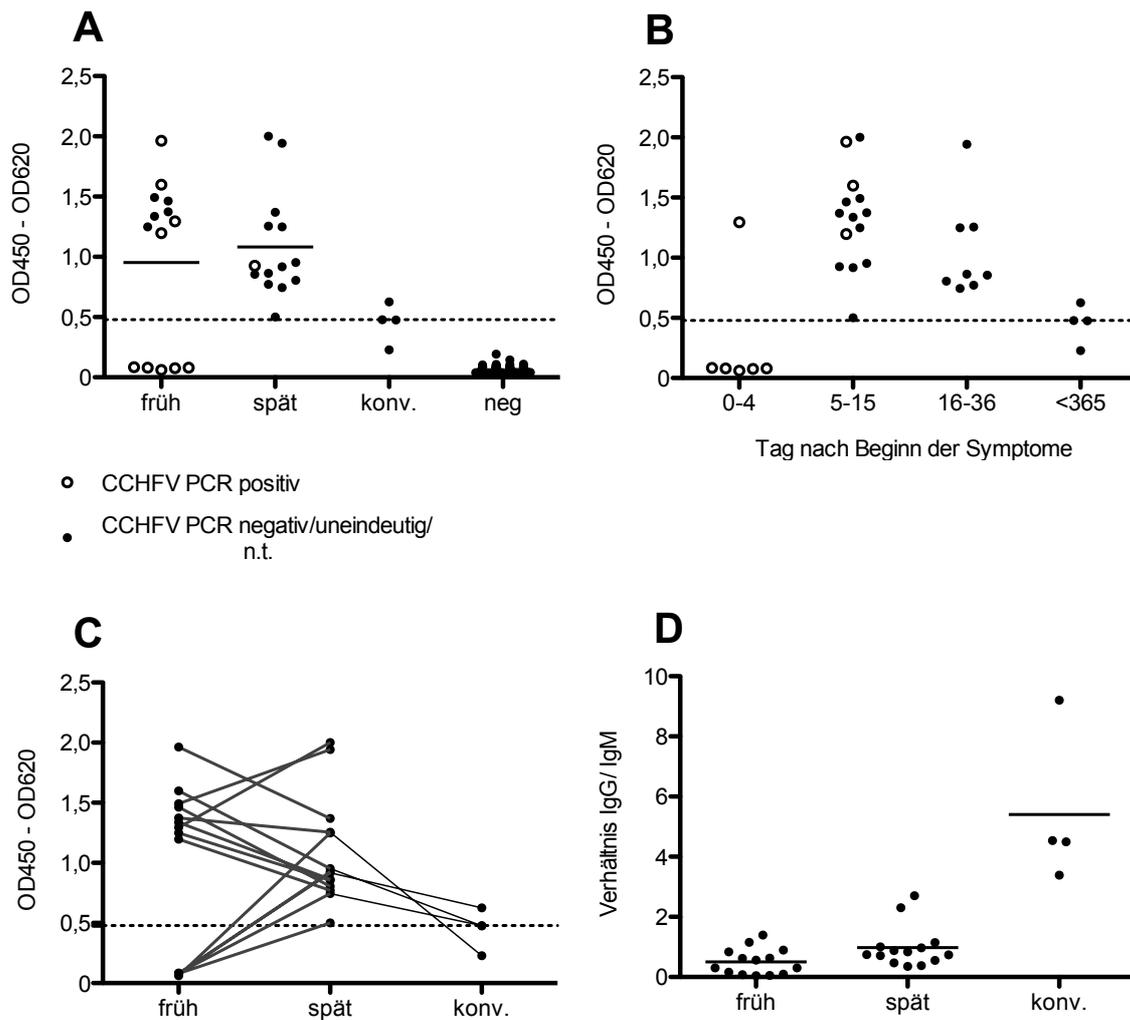
Von den 15 Patienten war von 14 Patienten jeweils eine frühe Serumprobe (teilweise PCR positiv und oder IgM-IFT positiv) und eine darauffolgende Serumprobe zwischen dem 3.-28. Tag nach Abnahme der ersten Probe vorhanden. Von 4 Patienten gab es zusätzlich eine konvaleszente Serumprobe, die ca. 1 Jahr nach der frühen Serumprobe entnommen wurde. Dieses verkleinerte Serumpanel wurde genauer untersucht.

Die im IgM-IC-ELISA (24 h) ermittelten Extinktionswerte der 32 Seren von 14 Patienten wurden anhand des Zeitpunktes der Probenentnahme grafisch dargestellt (Abb. 31A). Die Bestimmung des Cutoff's erfolgte mit der ROC-Analyse der MedCalc Software. Hierfür wurden die Proben nicht wie bisher in anti-CCHFV IgM positiv und negativ unterteilt, die rekonvaleszenten Patientenproben wurden bei der Berechnung des Cutoff's als negative Proben klassifiziert. Durch diese Neugruppierung sollte eine optimale Abtrennung zwischen akuten und rekonvaleszenten CCHFV-Infektionen durch den Assay ermöglicht werden. Der Cutoff wurde durch dieses Vorgehen von 0,11 auf 0,478 hoch gesetzt. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit persistierende anti-CCHFV IgM-Ak vorheriger CCHFV-Infektionen von akuten Infektionen zu unterscheiden, birgt aber die Gefahr, beginnende Infektionen (niedrige IgM-Konzentration) als falsch negativ zu detektieren. Dadurch ergeben sich folgende Ergebnisse:

Bei den frühen Serumproben konnte eine CCHFV-Infektion teilweise mit der PCR bestätigt werden, die Seren mit einem negativen / nicht eindeutigen PCR-Ergebnis konnten mit dem CCHFV IgM-IC ELISA (24 h) als positiv detektiert werden. Die späten Proben wurden alle durch den CCHFV IgM-IC ELISA (24 h) als positiv erkannt. Bei den rekonvaleszenten Proben lagen drei Proben unterhalb oder um den Cutoff, eine Probe lag oberhalb des Cutoff's. Bei der Betrachtung der 32 humanen Serumproben in Abhängigkeit zum zeitlichen Beginn der Symptome konnte festgestellt werden, dass der CCHFV-IgM-IC-ELISA CCHFV-Infektionen ab dem 5. Tag nach Beginn der Symptome nachweisen kann (Abb. 31B).

Durch die Darstellung der Extinktionswerte der 32 Seren in Abhängigkeit zu einander können Informationen über die Serokonversion abgelesen werden (Abb. 31C). Bei dem Vergleich der 4 frühen PCR-positiven Serumproben (IgM-IC ELISA (24 h) negativ) mit den dazugehörigen späten Serumproben ist ein IgM-Titer Anstieg zu beobachten. In der späteren Patientenprobe konnte eine CCHFV-Infektion mit dem ELISA nachgewiesen werden. Bei allen rekonvaleszenten Proben ist eine konstante Abnahme des Extinktionswert, ausgehend von der frühen Probe, zu erkennen.

Durch die Division der Extinktionswerte des IgG-IC-ELISA mit denen des IgM-IC-ELISA konnten akute Infektionen von älteren Infektionen unterschieden werden. Ein hoher Wert deutet auf eine ältere/vorangegangene Infektion hin, weil mehr IgG Antikörper als IgM Antikörper im Serum vorhanden sind, ein geringer Quotient deutet somit auf eine akute Infektion hin. Die IgG/IgM-Quotienten der einzelnen Serumproben wurden anschließend grafisch dargestellt (Abb. 31D). Die Werte für die rekonvaleszenten Proben sind am größten.



**Abbildung 31: Analyse von 32 humanen Seren von 14 Patienten aus dem Kosovo.** ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:50.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB; MedCalc-Cutoff: 0,478 (gestrichelte Linie); Seren: früh: CCHFV-PCR bestätigte oder anti-CCHFV IgM positive Patientenproben; spät: Patientenproben, die 3.-28.d später nach der frühen entnommen wurden, anti-CCHFV IgM positiv; konv.: rekonvaleszente Proben, Probenabnahme ca. 1 Jahr nach frühen Probe; neg: anti-CCHFV IgM negative Seren

(A) Die Extinktionswerte des CCHFV-IgM-IC-ELISA wurden in zeitabhängige Gruppen einsortiert und grafisch dargestellt. Die Seren wurden zusätzlich unterteilt in CCHFV PCR positiv (durchsichtige Punkte) oder CCHFV PCR negativ/uneindeutig bzw. nicht durchgeführt (schwarze Punkte).

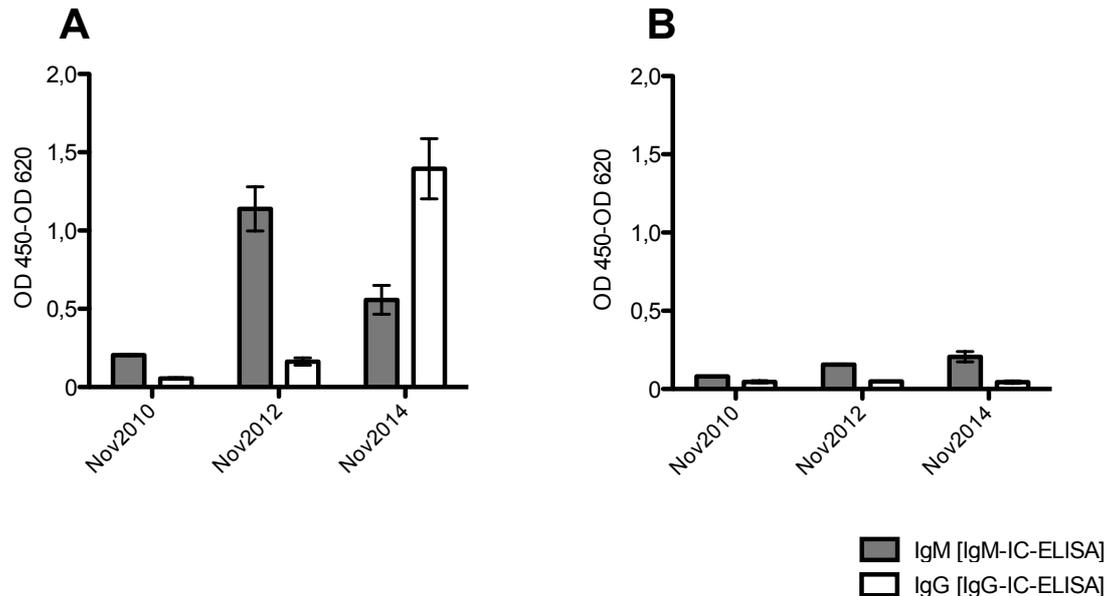
(B) Die 32 humanen Serumproben wurden nach dem Tag der Beginn der Symptome aufgetragen.

(C) Die Serokonversion der Serumproben wurde für jeden Patienten dargestellt.

(D) Die Extinktionswerte des IgG-IC-ELISA wurden durch die der IgM-IC-ELISA dividiert und grafisch dargestellt. IgG-IC-ELISA-Bedingungen: Serumverdünnung 1:200 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:250.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB

Die Messung von Serumproben tierischen Ursprungs, ohne Änderung der ELISA-Komponenten, stellt eine Besonderheit des IC-ELISA dar. Um dies zu verifizieren, wurden von Zeburindern einer Herde aus Kamerun (beginnend im Alter von ca. 8 Monaten) jeweils drei Serumproben analysiert. Diese wurden den Rindern im Abstand von zwei Jahren entnommen.

Die Extinktionswerte des IgM-IC-ELISA und des IgG-IC-ELISA wurden grafisch dargestellt (Abb. 32, A: Rind A, B: Rind B). Bei der Betrachtung der IgM- und IgG-IC-ELISA Ergebnisse wurde deutlich, dass bei Rind A im November 2012 nur IgM-Ak detektiert werden konnten. Nach 2 Jahren konnte ein Rückgang der IgM-Konzentration und eine erhöhte IgG-Konzentration beobachtet werden. Bei dem Rind B konnten innerhalb der 4 Jahre keine IgM- und IgG-Antikörper nachgewiesen werden.



**Abbildung 32: Analyse von 2 aufeinanderfolgenden Serumproben von 3 Zeburindern aus Kamerun.** IgM-IC-ELISA: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:150.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB; IgG-IC-ELISA: Serumverdünnung 1:200 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:250.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB

(A) Darstellung der Extinktionswerte des IgM-IC ELISA und IgG-IC ELISA für Rind A.

(B) Darstellung der Extinktionswerte des IgM-IC ELISA und IgG-IC ELISA für Rind B .

### 3.3.2.5 Vergleich des CCHFV-IgM-IC-ELISA mit einem *in-house* $\mu$ -Capture-ELISA

Die Ergebnisse des Serumpanels mit dem CCHFV-IgM-IC-ELISA aus Kapitel 3.3.3.3 wurden mit einem *in-house*  $\mu$ -Capture-ELISA verglichen und in Tabelle 10 dargestellt. Für beide ELISA wurde das CCHFV-NP/HRP als Antigen verwendet.

Bei dem  $\mu$ -Capture-ELISA binden die IgM-Antikörper im Serum an eine anti-human IgM beschichtete Platte, die gebundenen IgM-Antikörper werden in einem nächsten Schritt durch die Zugabe des HRP-markierten Antigen nachgewiesen.

Im IgM-IC-ELISA werden nur die spezifischen IgM-Antikörper in Immunkomplexen mit den Antigenen an eine His-Fc $\mu$ R-Ig beschichtete Platte gebunden und detektiert.

**Tabelle 10: Vergleich der Serumpanelergebnisse (179) von IgM-IC-ELISA und  $\mu$ -Capture-ELISA.**

IgM-IC-ELISA: Serumverdünnung 1:100 in SDB (final), Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:50.000 (final) in CDB, IC-Inkubation: 24 h, 4 °C, Reaktionsentwicklung: 10 min TMB;

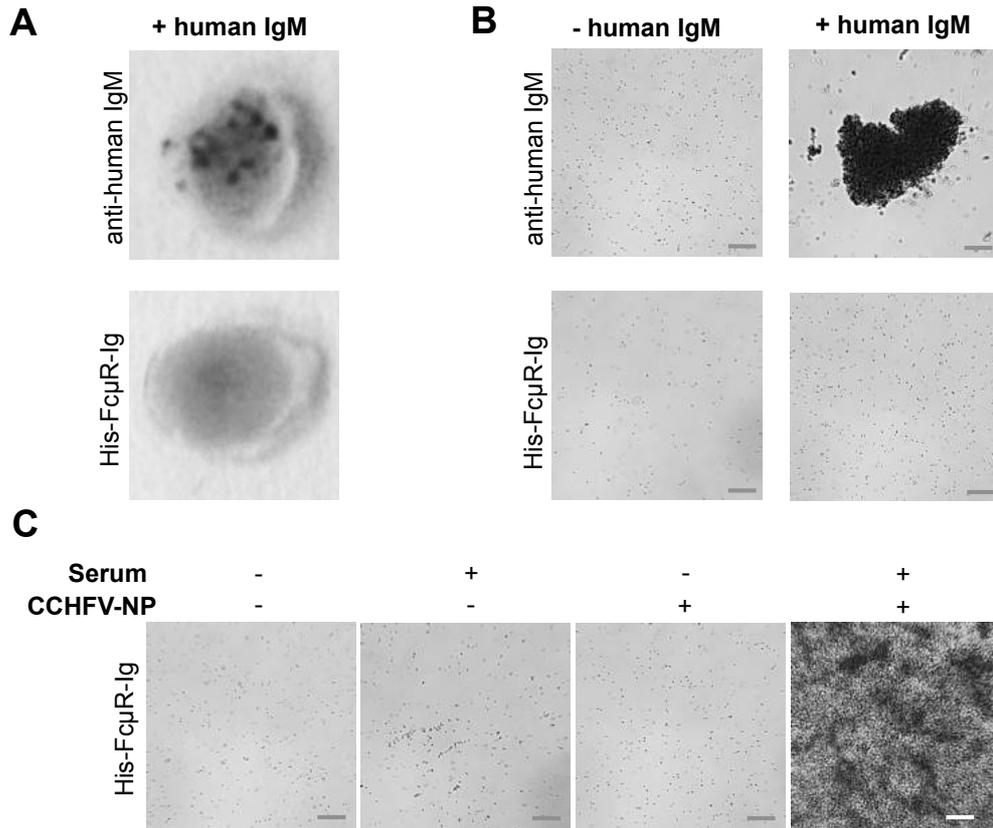
$\mu$ -Capture-ELISA: Serumverdünnung 1:100 in SDB, Antigenverdünnung CCHFV-NP/HRP 1:50.000 in CDB, Seruminkubation: 1 h, RT; Antigeninkubation: 1 h, RT; Reaktionsentwicklung: 10 min TMB; Die Extinktionswerte wurden durch den Cutoff (IgM-IC-ELISA 0,11,  $\mu$ -Capture-ELISA 0,075) geteilt. Werte oberhalb des Cutoff's wurden als positiv gewertet, Werte unterhalb als negativ. Die positiv detektierten Seren wurden tabellarisch dargestellt. gB: gesunde Blutspendersonen; Malaria: Patientenproben mit einer akuten Malariainfektion (23 *P. falciparum*, 11 *P. malariae*); Flavivirus: 8 Patientenproben mit einer primären DENV-Infektion, 2 Patientenproben mit einer TBEV-Infektion.

Serumproben		Anz. positiv CCHFV-IgM-IC-ELISA	Anz. positiv $\mu$ -Capture-ELISA
Beschreibung	Anz.		
<b>CCHFV IgM positiv</b>	59	59	59
		<b>Sensitivität 100 %</b>	<b>Sensitivität 100 %</b>
gB Europa	48	1	1
gB Süd Amerika	14	1	0
gB Asien	14	0	0
Malariainfektionen	34	0	0
Flavivirusinfektionen	10	0	0
<b>CCHFV IgM negativ</b>	<b>120</b>	2	1
		<b>Spezifität 98 %</b>	<b>Spezifität 99 %</b>

Aus dem in Tabelle 10 dargestellten Vergleich wird deutlich, dass der CCHFV-IgM-IC ELISA (24 h) im gleichen Maße wie der  $\mu$ -Capture-ELISA zur Detektion von akuten CCHFV-Infektionen geeignet ist.

### 3.4 Weiterentwicklung zum Schnelltest: IgM/Antigen-Immunkomplexbindung durch His-Fc $\mu$ R-Ig

Im Bereich der wachsenden *point-of-care* Diagnostik liegt der Fokus bei der Entwicklung von Schnelltesten. Deshalb wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob His-Fc $\mu$ R-Ig für ein Aggregations-basierten Schnelltest eingesetzt werden kann. Hierfür wurde Fc $\mu$ R-Ig-His an Latexpartikel kovalent gebunden. Zum Vergleich wurden Latexpartikel mit kovalent gebundenem anti-human IgM eingesetzt. Die ersten Versuche zeigten, dass nach Zugabe von humanem IgM, His-Fc $\mu$ R-Ig-beschichtete Partikel nicht aggregieren, im Gegensatz dazu konnten Aggregate bei anti-human IgM beschichteten Partikeln visuell nachgewiesen werden (Abb. 33A, B). Nach Inkubation der His-Fc $\mu$ R-Ig-beschichteten Latexpartikel mit CCHFV-NP und einer anti-CCHFV IgM positiven (RF negativen) Serumprobe konnten visuell Aggregate nachgewiesen werden (Abb. 33C). Bei der Inkubation mit Serum oder CCHFV-NP konnten keinen Aggregate beobachtet werden. Dieses Resultat könnte eine Grundlage für die Entwicklung von Schnelltesten zur Detektion von spezifischen IgM-Antikörpern gegen eine Vielzahl von Infektionskrankheiten darstellen.



**Abbildung 33: Schnelltest, basierend auf Latexpartikelaggregation.**

**(A),(B) Zugabe von humanem IgM zu beschichteten Latexpartikeln.** Blaue Latexpartikel (400 nm, Innova Biosciences) wurden mit 1 mg/ml His-Fc $\gamma$ R-Ig bzw. 0,1 mg/ml anti-human IgM nach Herstellerangaben beschichtet. Nach Inkubation mit 1-4  $\mu$ g humanem IgM (Acris Antibodies) für 1 h wurde der Ansatz für 1 min, 10.000 xg zentrifugiert und erneut für 1 h inkubiert. Anschließend wurden 3  $\mu$ l auf einen Objektträger aufgetragen und die Aggregate per Auge (A) und unter dem Mikroskop (Evos xl, 100 x Vergrößerung (B) untersucht. Dargestellt wurde repräsentativ das Ergebnis mit 1  $\mu$ g. Maßstab: 10  $\mu$ m.

**(C) Zugabe von CCHFV-NP und anti-CCHFV IgM positivem Serum zu His-Fc $\gamma$ R-Ig-beschichteten Latexpartikeln.** Dargestellt wurde die Aggregationsbildung der His-Fc $\gamma$ R-Ig-beschichteten Latexpartikel. Der Versuch wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt, jedoch mit verlängerter Inkubationszeit (je 2 h). Die Aggregate wurde mit dem Evos xl (100 x Vergrößerung) ausfindig gemacht und fotografiert. Maßstab: 10  $\mu$ m.

## 4 Diskussion

### 4.1 Fc $\mu$ R: Herstellung und Potential als Capture-Molekül

Der 2011 entwickelte IgG-Immunkomplex-ELISA zur Detektion von virusspezifischen IgG-Immunkomplexen [85] stellte die Grundlage für die Entwicklung des IgM-IC-ELISA in dieser Arbeit dar. Die Basis des IgG-IC-ELISA sind die Immunglobulin-ähnlichen Domänen des Fc $\gamma$ RIIa, die IgG-Ak in Immunkomplexform binden können und dadurch eine sensitive und spezifische Detektion von Virusinfektionen ermöglichen [85]. 2009 wurde der Fc $\mu$ R als IgM-bindender Rezeptor durch die Arbeitsgruppe von Prof. Hiromi Kubagawa identifiziert [75]. Die in der extrazellulären Region enthaltenen Immunglobulin-ähnlichen Domäne (Ig-Domäne) wurde im Rahmen meiner Masterarbeit erstmalig rekombinant in einem bakteriellen Expressionssystem hergestellt [87]. Das bakterielle Expressionssystem hat sich bei der Herstellung von extrazellulären Domänen von Fc-Rezeptoren bereits bewährt [101]. Die aufgrund der nicht vorhandenen posttranslationalen Modifikation fehlende Glykosylierung hat keinen Einfluss auf die spezifische Antikörperbindung von Fc-Rezeptoren [101-103], weshalb ein bakterielles Expressionssystem aus Kostengründen und aus Gründen der einfacheren und schnelleren Handhabung ausgewählt wurde [101].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ursprünglich verwendete Protokoll zur Produktion der Ig-Domäne des Fc $\mu$ R (His-Fc $\mu$ R-Ig) [87] im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit und die Proteinausbeute überarbeitet. Die hinzugefügte Gelfiltration ermöglichte dabei eine essentielle Abtrennung von Fc $\mu$ R-Monomeren von nicht-funktionalen Proteinaggregaten (Abb. 16D). Im weiteren Verlauf der IgM-IC-ELISA Entwicklung stellte sich heraus, dass der Fc $\mu$ R in monomerer Form IgM-Immunkomplexe binden kann. Die Proteinaggregate sind vermutlich falsch gefaltete His-Fc $\mu$ R-Ig, die über die intermolekularen Disulfidbrücken so verknüpft sind, dass keine Bindung von Immunkomplexen mehr möglich ist. Die Abtrennung von Proteinaggregaten wurde in der Literatur bei der rekombinanten Herstellung der extrazellulären Domäne des Fc $\gamma$ RIIb ebenfalls beschrieben [101].

Eine stabile Beschichtung des His-Fc $\mu$ R-Ig an die Oberfläche von ELISA-Streifen ist eine Grundvoraussetzung, um einen ELISA etablieren zu können. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass eine stabile Lagerung von mit der Fc $\mu$ R-Domäne beschichteten Platten bei 4 °C für mindestens 6 Monate möglich ist (Abb. 17C).

Die Charakterisierung der Bindungseigenschaften zur Identifikation der Ig-Domäne als Capture-Molekül ergab, dass die Ig-Domäne des Rezeptors spezifisch IgM-Immunkomplexe, unabhängig vom Serumursprung (tierisch oder human), bindet (Abb. 20)

und dass IgM in alleiniger Form nicht gebunden werden kann (Abb. 19). Letzteres wurde bisher bei nativen, auf der Zelloberfläche exprimierten Fc $\mu$ R nicht beobachtet. Der native Fc $\mu$ R besitzt die Fähigkeit, IgM-Ak auch in alleiniger Form zu binden [75]. Fc-Rezeptoren zeichnen jedoch aus, dass sie nur von Antikörpern besetzt werden können, die zuvor Antigene gebunden haben, wodurch spezifische Signaltransduktionen ausgelöst werden können [62]. Die Arbeitsgruppe von Prof. Hiromi Kubagawa konnte allerdings einige Jahre später einen Unterschied in der Bindungsaffinität von IgM-Ak, gebunden an eine Zelloberfläche und freie IgM-Immunkomplexe bzw. freie IgM-Ak beobachten [84]. Dies bedeutet, dass der native Fc $\mu$ R zwar lösliche IgM-Ak bindet [75], aber die Bindung an membrangebundene IgM-Ak derselben Zelloberfläche effizienter ist [84].

Der Unterschied zwischen dem in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnis und dem in der Literatur könnte auch auf die unterschiedliche Strukturform des Fc $\mu$ R zurückgeführt werden. Die Bindung von IgM-Ak ohne Antigen durch den nativen Fc $\mu$ R könnte durch die flexible Zytoplasmadomäne aufgrund einer Reorientierung des Rezeptors ermöglicht werden. Eine Drehung des Rezeptors durch die Zytoplasmaregion konnte bei dem Fc $\gamma$ R1a beobachtet werden; durch diesen Vorgang wird eine bessere Fc-Erkennung für möglich gehalten [104]. In dieser Arbeit wurde nur die Ig-Domäne des Fc $\mu$ R rekombinant hergestellt, die anschließend nicht-kovalent an eine Oberfläche gebunden wird. Die Bindung der Domäne an die Oberfläche der aus Polystyrol bestehenden ELISA-Streifen wird über passive Adsorption (hydrophobe Wechselwirkungen) ermöglicht [105]. Durch die Bindung an die Oberfläche der ELISA-Streifen ist die Ig-Domäne vermutlich nicht mehr in dem gleichen Maße zugänglich wie im nativen Fc $\mu$ R. Dies könnte eine Ursache für den Unterschied zwischen den Bindungseigenschaften beim rekombinanten und nativen Fc $\mu$ R sein.

In dieser Arbeit konnte mit weiteren Untersuchungen die Bindung von IgG-Immunkomplexen an die Ig-Domäne des Fc $\mu$ R ausgeschlossen werden (Abb. 20). Dieses Ergebnis entspricht den in der Literatur beschriebenen Versuchen zur Bindungscharakterisierung des an der Oberfläche von eukaryotischen Zellen präsentierten Fc $\mu$ R [74, 75].

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit die Ig-Domäne des Fc $\mu$ R erfolgreich rekombinant unter ISO 13485-konformen Bedingungen produziert und charakterisiert werden. Mit der stabilen Oberflächenbeschichtung und reproduzierbaren Herstellung der Ig-Domäne konnten wichtige Grundvoraussetzungen für die Etablierung des IgM-IC-ELISA erfüllt werden. Die Bindungscharakterisierung identifizierte das Protein als Capture-Molekül, wodurch ein IgM-IC-ELISA entwickelt werden konnte.

## 4.2 Evaluierung des IgM-IC-ELISA

### Relevanz von ISO 13485-konformen Testsystemen

Weltweit, so auch in den westlichen Industrienationen, steigt der Bedarf an zuverlässigen Testverfahren zur Detektion von Infektionen mit tropischen Krankheitserregern. Urlauber, aber auch Mitarbeiter internationaler Unternehmen können sich infizieren und so z.B. virale Infektionen in ihre Heimatländer einführen. Dadurch wird das Problem von Virusinfektionen zum globalen Thema. Die Detektion von seltenen, arboviralen Infektionen ist jedoch nur einigen wenigen Speziallaboren vorenthalten. Gründe hierfür sind zum einen, dass nur wenige Testkits kommerziell erhältlich sind und zum anderen, dass hohe Sicherheitsstandards (S3, S4) eingehalten werden und dass ein spezielles Know-how vorhanden sein muss [52].

Bei der Entwicklung von In-vitro-Diagnostika (IVD) führen strenge Richtlinien dazu, dass kommerzielle Testkits unter ISO 13485-konformen Bedingungen hergestellt werden müssen. Dadurch wird eine hohe Qualität innerhalb der Entwicklung und Produktion von Testkits gewährleistet [106]. In einem Bericht von 2008 wurde bereits darauf aufmerksam gemacht, dass durch den strengen Qualitätssicherungsprozess und die integrierten Kontrollen kommerzielle ELISA zuverlässigere Ergebnisse liefern als *in-house* Assays [107]. Im Hinblick auf eine zukünftige Kommerzialisierung wurde der in dieser Arbeit entwickelte IgM-IC-ELISA deshalb unter Bedingungen entwickelt, die dem Internationalen Qualitätsstandard ISO:13485 entsprechen.

### Herausforderung bei der Testevaluierung: Serumpanel

Ein wichtiger Punkt bei der Entwicklung von serologischen Tests ist die Akquirierung von gut charakterisierten Serumpaneln. Hierbei ist zu beachten, dass die Serumproben frisch bzw. die Lagerungszeit und Lagerungsbedingungen gut kontrolliert werden. Es wurde bereits beschrieben, dass eine längere Lagerung der Seren bei -20 °C die Antikörperreaktivität reduzieren kann [108]. Deshalb wurden die in dieser Arbeit verwendeten Seren bei -80 °C gelagert. Um wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen zu vermeiden, wurden kleinere Aliquots bei 4 °C für die Dauer der Testevaluierung aufbewahrt. Dadurch konnte bei dem Vergleich der Testsysteme zusätzlich sichergestellt werden, dass die Qualität der Seren gleich ist.

Zum anderen sind gut charakterisierte Serumpaneln eine wichtige Voraussetzung, um einen Test evaluieren und validieren zu können. In dieser Arbeit konnte auf aktuelle Serumproben mit PCR-bestätigten Virusinfektionen zurückgegriffen werden. Die Validierung und Evaluierung des IgM-IC-ELISA konnte für den ZIKV-IgM-IC-ELISA mit Proben aus der Epidemie in Brasilien (2015-2016) durchgeführt werden, für den CCHFV-IgM-IC-ELISA mit gesammelten Proben aus dem Kosovo (2013-2014). Dies

war Dank der Kooperationen mit Frau Dr. Petra Emmerich aus dem BNITM (CCHFV) und Dr. Ana Maria Bispo de Filippis vom Fiocruz Institut in Brasilien (ZIKV) möglich.

### **Die Bedeutung des Antigens im IgM-IC-ELISA**

Bei der Entwicklung des Flavivirus-IgM-IC-ELISA wurde zunächst das E-Protein als potentielles Antigen ausgewählt. Das E-Protein bildet die äußerste Schicht und induziert durch den direkten Kontakt mit dem Immunsystem des Wirtes eine humorale Immunantwort [22]. Es beinhaltet virusspezifische, virussubtypspezifische und flavivirusspezifische (kreuzreaktiven) Epitope [22, 99]. Die kreuzreaktiven Epitope befinden sich hauptsächlich in der E-Domäne 2 (ED2), virusspezifische und virussubtypspezifische Epitope liegen in den E-Domänen 1 (ED1) und 3 (ED3) [22].

Bei der Evaluierung des WNV-IgM-IC-ELISA zeigte sich, dass eine optimale Trennung der Extinktionswerte von anti-WNV IgM positiven und negativen Seren nicht gegeben ist (Abb. 22). Dadurch ist mitunter die Differenzierung zwischen anti-WNV IgM positiven und kreuzreaktiven (Dengue-Virus infizierte Seren) Seren schwierig. Dies ist bei der Verwendung des ganzen E-Proteins, sowie wenn nur eine Teildomäne des E-Proteins (ED3) als Antigen eingesetzt wird, der Fall. Beim ED3-Antigen könnte dies auf die geringe Epitopenanzahl von 5-6 [85] zurückgeführt werden. Das WNV-ED3-Antigen besitzt ein Molekulargewicht von 14,8 kDa, dadurch ist die Bindung der größeren IgM-Moleküle (ca. 1000 kDa) [62] eine sterische Herausforderung. Die Ursache für die falsch-positiven Ergebnisse beim IgM-IC-ELISA mit WNV-EP (43 kDa) können durch die zusätzlichen Domänen ED1 und ED2 erklärt werden. Durch die flavivirusspezifischen und virussubtypspezifischen Epitope können Infektionen mit anderen Flaviviren aufgrund gebildeter IgM-Ak gegen diese Epitope zu Kreuzreaktionen in serologischen Testsystemen führen [85, 109]. Die Ergebnisse des WNV-IgM-IC-ELISA deuten daraufhin, dass das E-Protein nicht das ideale Antigen zur Detektion von anti-WNV IgM-Ak im IC-ELISA ist. Dies ließ sich auch bei der Entwicklung des ZIKV-IgM-IC-ELISA beobachten.

Im ZIKV-IgM-IC-ELISA konnten mit dem ZIKV-EP und dem ZIKV-ED3 als jeweiliges Antigen keine Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für die Entwicklung des ZIKV-IgM-IC-ELISA das Nicht-Strukturprotein 1 (NS1) als potentielles Antigen rekombinant hergestellt. Erste Publikationen deuten auf ein hohes Potential des NS1 bei der Erkennung von akuten Flavivirus-Infektionen hin [110-113]. Durch die Sekretion von NS1 in den Blutstrom kommt das Protein mit dem Immunsystem in Kontakt und es werden spezifische Antikörper ausgebildet [114, 115]. Zudem zeigte eine Analyse der Proteinepitope beim DENV-E-Protein im Vergleich zum DENV-NS1 mehr virusspezifische Epitope auf dem NS1-Protein [113, 116]. Die Verwendung von NS1 in

serologischen Testsystemen würde zusätzlich den Vorteil einer Differenzierung zwischen einer Virus-Infektion und einer Virus-Impfung ermöglichen [112, 113]. Der Impfstoff des JEV beinhaltet Formalin-inaktivierte Viren (nur bestehend aus Strukturproteinen, können kein NS1 mehr freisetzen). Dadurch können keine Antikörper gegen das NS1 ausgebildet werden und eine serologische Differenzierung wird ermöglicht [112, 113]. Indessen handelt es sich bei dem YFV-Impfstoff um einen abgeschwächten Lebendimpfstoff, der zu milden Erkrankungen und damit auch zur Ausbildung von anti-NS1 Antikörpern führt [113]. Bisher fehlen ausführliche Studien und etablierte Testsysteme, die das Antigenpotential des NS1 zur Detektion von Flaviviren genau evaluieren. Ein kommerzielles Testsystem, das NS1 als Antigen zur Detektion von ZIKV-Infektionen einsetzt, ist allerdings bereits CE-markiert worden (anti-ZIKV IgG/IgM, Euroimmun AG) [114, 117-120].

### **Nachweis der Reproduzierbarkeit und Präzision des IgM-IC-ELISA**

Um die Reduzierbarkeit und Zuverlässigkeit eines ELISA nachzuweisen, werden die Intra- und Inter-Assay Variationen bestimmt. Dadurch wird gewährleistet, dass die generierten Testergebnisse von parallel durchgeführten Ansätzen (Dreifachbestimmungen, Intra) und an unterschiedlichen Tagen (Inter) vergleichbar sind. Das heißt, dass die Schwankungen durch u.a. Pipettieren und äußere Einflüsse (Temperatur) so minimiert sind, dass das ELISA-Ergebnis nicht beeinflusst wird.

Nach internationalem Qualitätsmaßstab sollte die Intra- und Inter-Assay Variation unter 10 % liegen [121]. Beim ZIKV-IgM-IC-ELISA wurde eine Intra-Assay Variation unter 5 % und eine Inter-Assay Variation um 10 % ermittelt (Abb. 24). Die Intra- und Inter-Assay Variation des CCHFV-IgM-IC-ELISA lagen unter 6 % (Abb. 28). Damit konnten die Kriterien für die Reproduzierbarkeit und Präzision bei dem IgM-IC-ELISA erfüllt werden.

### **Sensitivität und Spezifität des IgM-IC-ELISA**

Die Sensitivität und Spezifität sind Kenngrößen, die eine Aussage über die Genauigkeit des ELISA ermöglichen. Sie geben an, wie hoch der Anteil richtig klassifizierter Befunde ist [122]. Hierbei wird die analytische Sensitivität/Spezifität von der diagnostischen Sensitivität/Spezifität unterschieden [123]. Die analytische Sensitivität gibt die Nachweisstärke eines Testes an, d.h. im Falle für den IgM-IC-ELISA, wie viele Seren mit nachweislichen virusspezifischen IgM-Titer positiv erkannt werden. Die diagnostische Sensitivität gibt hingegen die Wahrscheinlichkeit an, die kranken Patienten auch als tatsächlich krank mit einem diagnostischen Test zu identifizieren. Diagnostische und analytische Sensitivität stimmen im Idealfall überein. Allerdings kann ein Patient im

frühen Infektionsstadium noch keine IgM-Ak gegen das Virus ausgebildet haben, wodurch die diagnostische Sensitivität in diesen Fällen immer geringer ist als die analytische. Mit der analytischen Spezifität wird beschrieben, inwieweit die Testmethode nur das misst, was sie messen soll. Die diagnostische Spezifität gibt indessen die Wahrscheinlichkeit an, alle Nicht-Erkrankten korrekt zu erkennen [123].

Zur Beurteilung der Qualität des ZIKV-IgM-IC-ELISA und des CCHFV-IgM-IC-ELISA wurde die analytische Sensitivität und Spezifität ermittelt.

Hierfür wurde beim ZIKV-IgM-IC-ELISA ein Serumpanel mit 28 Patientenseren der aktuellen ZIKV-Epidemie (ZIKV-PCR bestätigt, Kooperation mit dem Fiocruz Institut, Rio de Janeiro) und 128 anti-ZIKV IgM negativen Seren getestet. Anhand dieses Serumpanels konnte die Sensitivität und Spezifität des ZIKV-IgM-IC-ELISA zu 100 % (anti-ZIKV IgM positive Seren ab dem 5. Tag nach Beginn der Symptome) und 99 % bestimmt werden (Abb. 25). Lediglich ein Serum eines Blutspenders mit einer YFV-Impfung und ein Serum mit einer akuten Malariainfektion führten zu einem erhöhten Extinktionssignal und lagen im Bereich des Cutoff's.

Das ZIKV zirkuliert zum Teil in den gleichen geografischen Regionen wie das DENV, zusätzlich ist eine klinische und diagnostische Unterscheidung aufgrund von ähnlichen Symptomen und serologischen Kreuzreaktionen eine Herausforderung [17, 124]. Im ZIKV-IgM-IC-ELISA wurden alle 43 Serumproben mit Dengue-Infektionen als negativ detektiert (Abb. 25B).

Für die Evaluierung der analytischen Sensitivität und Spezifität des CCHFV-IgM-IC-ELISA diente ein Serumpanel bestehend aus 59 anti-CCHFV IgM positiven (IFT bestätigt) Proben, gesammelt in 2013/2014 aus dem Kosovo (zur Verfügung gestellt von Dr. Petra Emmerich und Prof. Salih Ahmeti) und 120 anti-CCHFV IgM negativen Proben. Für den CCHFV-IgM-IC-ELISA wurde eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98 % ermittelt (Abb. 30A, B).

Die Immunkomplexbildung wird durch eine 24 h-Inkubation des ELISA ermöglicht [85], in der Akutdiagnostik sind kurze Inkubationszeiten jedoch von großer Bedeutung, um schnelle Diagnosen und damit Therapien zu ermöglichen [51]. Deshalb wurde die Sensitivität und Spezifität des CCHFV-IgM-IC-ELISA zusätzlich mit einer verkürzten 4 h-Inkubation zu je 98 % bestimmt (Abb. 30C). Durch die hohen Sensitivitäts- und Spezifitätswerte wird deutlich, dass der CCHFV-IgM-IC-ELISA ein effizientes Mittel zur Identifikation von akuten CCHFV-Infektionen ist und eine Diagnose bereits nach 4 h getroffen werden kann.

Die simultane Zugabe des markierten Antigens und der Serumprobe im IgM-IC-ELISA ermöglicht eine sehr einfache, technische Umsetzung. Des Weiteren sind nur ein Inkubationsschritt und wenige Waschriffe bis zur photometrischen Messung des ELISA

notwendig [85]. Dadurch können Befunde in kurzer Zeit (4 h) und mit geringem Aufwand ermittelt werden, wodurch eine schnelle spezifische Behandlung von Patienten in der medizinischen Diagnostik ermöglicht werden würde.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem IgM-IC-ELISA hohe Sensitivitäts- und Spezifitätswerte erreicht werden können, wodurch der IgM-IC-ELISA als Testsystem zur Detektion von akuten Infektionen zukünftig eingesetzt werden könnte.

### **Ermittlung des validen Anwendungsbereiches des IgM-IC-ELISA anhand der virusinfizierten Proben aktueller Ausbrüche**

Der Grundgedanke bei der Entwicklung des IgM-IC-ELISA war es, eine diagnostische Methode zu entwickeln, die eine verlässliche Identifikation von u.a. engverwandten Virusinfektionen (z.B. Flaviviren) ermöglicht und bei akuten Ausbrüchen zur medizinischen Diagnostik eingesetzt werden kann.

Anti-ZIKV IgM werden nach der Virusinfektion meistens in der ersten Woche nach Beginn der Symptome gebildet und können nach dem Erreichen eines spezifischen Detektionslimit nachgewiesen werden. Sie sind in den meisten Fällen 8-12 Wochen lang vorhanden [39, 59]. Mit dem ZIKV-IgM-IC-ELISA konnte eine akute ZIKV-Infektion ab dem 5. Tag mit Beginn der Symptome nachgewiesen werden (Abb. 26B). Bei dem Vergleich der frühen Patientenprobe (0-5 d nach Beginn der Symptome) mit der späten (5-15 d nach Beginn der Symptome) ist bei allen Patienten ein IgM-Titeranstieg zu erkennen (Abb. 26C).

Mithilfe der im Kosovo gesammelten Serumproben von 14 Patienten konnte nach erfolgreicher Validierung des CCHFV-IgM-IC-ELISA der Anwendungsbereich des ELISA genauer charakterisiert werden. Von den 14 CCHFV-PCR bestätigten Patienten war jeweils eine frühe, eine späte (3-28 d nach Abnahme der ersten Probe) und teilweise eine rekonvaleszente (ca. 1 Jahr nach Abnahme der ersten Probe) Serumprobe vorhanden.

Bei dem Vergleich der CCHFV-IgM-IC-ELISA Ergebnisse mit den CCHFV-PCR Ergebnissen wird deutlich, dass der IgM-IC-ELISA alle Seren positiv identifiziert, die nicht mehr PCR positiv sind (Abb. 31A). Die Detektion einer CCHFV-Infektion ist ab dem 5. Tag nach Beginn der Symptome mit dem CCHFV-IgM-IC-ELISA möglich (Abb. 31B).

Die nach einer Virusinfektion gebildeten anti-CCHFV IgM-Ak sind nach 5-7 Tagen nach Beginn der Symptome detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt ist das Virus bzw. die Virus-RNA oft nicht mehr im Körper vorhanden und somit durch z.B. PCR nicht mehr nachweisbar. Ein guter serologischer Test ist dadurch unabdingbar, um akute Infektionen, die nicht mehr PCR positiv sind, zu erkennen [50, 125]. Dieses Kriterium erfüllt der CCHFV-IgM-IC-ELISA.

Die anti-CCHFV IgM-Ak können jedoch mehrere Monate oder bis zu einem Jahr nach der Infektion noch im Körper persistieren [125]. Dadurch ist es mit serologischen Nachweismethoden mitunter schwierig, akute von bereits überstandenen Infektionen zu unterscheiden. Eine Differenzierung ist durch die Betrachtung konsekutiver Seren eines Patienten jedoch möglich [50]. Bei den 4 Patienten, die in der frühen Probe PCR positiv waren und IgM negativ im IgM-IC-ELISA konnte ein IgM-Konzentrationsanstieg in der folgenden Probe durch eine positive Detektion im IgM-IC-ELISA nachgewiesen werden (Abb. 31C). Bei den anderen 10 Patienten ist der IgM-Wert in der ersten Probe am höchsten und nimmt dann kontinuierlich über die Zeit ab, d.h. es handelt sich um akute CCHFV-Infektionen, die unterschiedlich weit fortgeschritten sind (Abb. 31C). Zieht man die Ergebnisse des CCHFV-IgG-IC-ELISA in die Betrachtung mit ein, lassen sich rekonvaleszente Serumproben von akuten eindeutig voneinander unterscheiden. Eine hohe IgG-Konzentration mit einer geringen IgM-Konzentration im Serum deutet auf eine bereits überstandene Infektion hin [4, 50, 126, 127]. Ein hoher Wert des IgG/IgM-Quotient identifiziert damit eine rekonvaleszente Serumprobe und konnte bei allen 4 Patienten bei der Serumprobe nach einem Jahr beobachtet werden (Abb. 31D). Zusammenfassend kann hieraus geschlossen werden, dass mit dem IgM-IC-ELISA, teilweise in Kombination mit dem IgG-IC-ELISA eine verlässliche Akutdiagnostik möglich ist. Der IgM-IC-ELISA kann CCHFV- und ZIKV-Infektionen ab dem 5. Tag nach Beginn der Symptome detektieren.

### **Vergleich des IgM-IC-ELISA mit etablierten ELISA-Methoden**

Um das Potential des IgM-IC-ELISA evaluieren zu können, wurde der ZIKV-IgM-IC-ELISA, der WNV-IgM-IC-ELISA und der CCHFV-IgM-IC-ELISA jeweils mit einem etablierten  $\mu$ -Capture ELISA oder einem kommerziellen Testkit verglichen.

Der indirekte IgM-ELISA von Euroimmun war der erste ELISA zur Detektion von akuten ZIKV-Infektionen, der ab Januar 2016 käuflich erworben werden konnte (CE-markiert) [58]. In den Publikationen von Huzly *et al.*, 2016 [118] und Steinhagen *et al.*, 2016 [114] wird die Sensitivität bei der Detektion von ZIKV-Infektionen mit 100 % angegeben, wenn die Ergebnisse des anti-ZIKV IgM und anti-ZIKV IgG ELISA zusammen betrachtet werden. Bezogen auf den MAC-ELISA wurde die Sensitivität des kombinierten IgG und IgM ELISA von Euroimmun in einer neueren Publikation nur mit 39,5 % angegeben [119]. Die alleinige Sensitivität des Euroimmun IgM-ELISA wurde zu 58,8 % bestimmt [114]. Die Spezifität, ermittelt mit einem umfangreichen Panel aus u.a. geimpften und infizierten Seren mit anderen Flaviviren, wird mit 99,8 % angegeben [114, 119].

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse des anti-ZIKV IgM Euroimmun ELISA ergaben eine Sensitivität von 43 % und eine Spezifität von 97 %. Damit konnte die in der Literatur angegebene geringe Sensitivität des anti-ZIKV IgM ELISA von Euroimmun bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem anti-ZIKV IgM ELISA von Euroimmun 3 akute Malariainfektionen, eine Masernvirusinfektionen und eine Rubella Virusinfektion als falsch-positiv detektiert (Abb. 27B). Seren mit Masernvirusinfektionen und einer Rubella-Virusinfektion wurde bei der Spezifitätsbestimmung des Euroimmun ELISA nicht getestet [114]. Das Problem von falsch-positiven Resultaten im Euroimmun ELISA durch Malariainfektionen ist bereits bekannt [120]. Durch eine Infektion mit *P.falciparum*, dem parasitären Auslöser der Malaria, kann es zu einer Aktivierung von polyklonalen B-Zellen kommen, wodurch Antikörper produziert werden, die nicht Mikroorganismen-spezifisch sind [120, 128]. Diese Besonderheit bei Malariainfektion könnte die falsch-positiven Ergebnisse erklären.

Durch den Vergleich mit dem kommerziellen Kit wird deutlich, dass der ZIKV-IgM-IC-ELISA alle anti-ZIKV IgM positiven Seren ab dem 5. Tag nach Beginn der Symptome erkennt, der anti-ZIKV IgM Euroimmun 43 %. Bei der Kombination der Ergebnisse des anti-ZIKV IgG und IgM ELISA von Euroimmun wird jedoch eine Sensitivität von 100 % erreicht (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist die Verwendung eines einzelnen IgM-Tests zur Detektion akuter Infektionen günstiger und bedeutet weniger Aufwand in der Durchführung und Auswertung, wodurch die Fehlerquellen gering gehalten werden können. Die geringe Sensitivität des anti-ZIKV IgM ELISA von Euroimmun lässt sich anhand des vom Hersteller festgelegten Cutoff's erklären. Der Cutoff beim Euroimmun IgM-ELISA liegt deutlich höher als beim dem ZIKV-IgM-IC-ELISA, wodurch viele anti-ZIKV IgM Seren unterhalb des Cutoff's liegen. Der Bereich, in dem die Extinktionswerte beider Testsysteme liegen, ist hingegen vergleichbar. Dies bestätigt den hohen Cutoff als Ursache für den Sensitivitätsverlust beim Euroimmun IgM-Kit.

Die Spezifität der beiden ELISA-Systeme ist vergleichbar, jedoch scheint der Euroimmun ELISA zu falsch-positiven Ergebnissen bei Malariainfektionen zu neigen (Abb. 27B). Dies muss vor allem bei der Verwendung des Euroimmun ELISA in Regionen mit endemischer Malaria wie in Afrika berücksichtigt werden.

Der kommerzielle Euroimmun ELISA und der neu entwickelte ZIKV-IgM-IC-ELISA basieren auf dem NS1-Antigen. Die beobachteten Unterschiede könnten auf die verschiedenen Assay Formate zurückgeführt werden [117]. Im indirekten ELISA von Euroimmun wird das NS1 an die Platte gebunden und ist dementsprechend nicht im gleichen Maße wie beim IgM-IC-ELISA frei zugänglich. Dadurch könnte es aus sterischen Gründen durch die Größe der IgM-Ak zu Unterschieden kommen.

Eine weitere Erklärung wäre die Glykosylierung des NS1-Proteins. Aufgrund der bakteriellen Expression des NS1-Antigens des IC-ELISA ist dieses nicht glykosyliert. Wenn das NS1-Protein im Euroimmun Kit im eukaryotischen Expressionssystem exprimiert wurde (nicht bekannt), liegt es glykosyliert vor. IgM-Ak binden auch an Zuckermoleküle im Antigen [76], wodurch der Effekt der falsch-positive Malariainfektionen im anti-ZIKV IgM ELISA von Euroimmun eventuell auch erklärt werden könnte.

Bei dem Verdacht auf eine ZIKV-Infektion empfiehlt die CDC für Serumproben, die 2-12 Wochen nach Beginn der Symptome entnommen wurden und für Serumproben, die innerhalb der ersten 14 Tage nach Beginn der Symptome abgenommen wurden und ZIKV RT-PCR negativ sind, den Nachweis von anti-ZIKV IgM zur Identifikation von ZIKV-Infektionen. Zur Detektion von anti-ZIKV IgM wird der MAC-ELISA von CDC als Goldstandard empfohlen [119]. Proben, die im MAC-ELISA positiv oder nicht eindeutige Ergebnisse zeigen, müssen anschließend im PRNT zur Bestätigung einer ZIKV-Infektion getestet werden [119]. Dieses Vorgehen ist sehr zeitintensiv, wodurch Diagnosen erst nach mehreren Tagen getroffen werden können. Des Weiteren sind falsch-positive Ergebnisse durch die Probleme beider Methoden mit kreuzreaktiven Antikörper eng verwandter Flaviviren nicht auszuschließen [117, 119]. Der ZIKV IgM-IC-ELISA liefert im Vergleich dazu ein Ergebnis in 24 h und falsch-positive Ergebnisse sind sehr selten (Spezifität 99 %). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach ausführlicher Evaluierung des ZIKV-IgM-IC-ELISA festgestellt werden, dass dieser eine gute Alternative zu den bisher verwendeten serologischen Testsystemen ist.

Der WNV-IgM-IC-ELISA wurde mit einem *in-house*  $\mu$ -Capture ELISA unter Verwendung derselben rekombinanten Antigene verglichen. Bei der Betrachtung beider Testsysteme wird deutlich, dass auch bei dem  $\mu$ -Capture-ELISA eine optimale Differenzierung zwischen anti-WNV IgM-Ak positiven und negativen Seren schwierig ist (Abb. 22B, D). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Ursache der falsch-positiven Ergebnissen nicht in dem jeweiligen ELISA-System, sondern bei der Art der verwendeten Antigene liegt.

Eine Studie zur Evaluierung der derzeitigen verwendeten serologischen Testsysteme zur Detektion von WNV-Infektionen ermittelte unzureichende Sensitivitäts- und Spezifitätswerte [109, 129]. Der kommerzielle *West Nile Virus IgM DxSelect ELISA* von Focus Diagnostics, ein  $\mu$ -Capture ELISA, ist einer der in der Studie verwendeten Testsysteme. In dieser Arbeit konnten mit dem Testkit von Focus Diagnostics alle anti-WNV IgM positiven Seren detektiert werden (Tab. 9). Der Test zeigte jedoch im Rahmen dieser Arbeit auch bei der Untersuchung einer Auswahl an kreuzreaktiven Seren die bekannten Spezifitätsprobleme [99, 130], vor allem mit JEV und DENV infizierten Seren.

Zur serologischen Detektion des CCHFV sind einige wenige ELISA kommerziell erhältlich. Einer dieser Tests ist der VectoCrimea-CHF-IgM von Vector Best ( $\mu$ -Capture ELISA) aus Russland. Laut Herstellerangaben besitzt der ELISA eine Sensitivität und Spezifität von 100 % [131]. Eine Studie in 2012 zeigte jedoch, dass die Sensitivität des Testes stark vom untersuchten Serumpanel abhängt. Vector Best selbst evaluierte die Sensitivität mit positiven Proben aus Russland. In der Studie von 2012 wurden positive Proben aus Albanien, Iran, Kosovo und Afrika südlich der Sahara getestet. Dadurch ergab sich eine Sensitivität von 88 %. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist die Zirkulation verschiedener Virusstämme [131].

Um den IC-ELISA mit dem herkömmlichen  $\mu$ -Capture-System genauer vergleichen zu können, wurde das Serumpanel im  $\mu$ -Capture ELISA mit dem gleichen rekombinanten CCHFV-NP gemessen. Das CCHFV-NP eignet sich durch die gute Sensitivität und Antigenität [47, 132] als Antigen zur serologischen Detektion von CCHFV-Infektionen. Bei dem Vergleich wird deutlich, dass der  $\mu$ -Capture-ELISA genauso effizient wie der IC-ELISA anti-CCHFV IgM positive Seren von negativen unterscheiden kann (Tab. 10). Der IgM-IC-ELISA ist daher eine gute Alternative zum bereits etablierten  $\mu$ -Capture-System, vor allem wenn Seren untersucht werden, bei denen zum Zeitpunkt der CCHFV-Infektion unspezifisches IgM-Ak z.B. durch Allergien oder auch Autoimmunerkrankungen [133, 134] im Körper persistiert. Im IgM-IC-ELISA werden nur spezifische CCHFV-IgM-IC gebunden, beim  $\mu$ -Capture ELISA werden zunächst alle im Serum enthaltenen IgM-Ak gebunden und nur die spezifischen anschließend durch das markierte Antigen detektiert. Bei diesen Fällen könnte sich im Hinblick auf die Sensitivität ein Vorteil beim Einsatz des IC-ELISA gegenüber dem  $\mu$ -Capture-ELISA ergeben.

### **Kompetition mit unmarkiertem Antigen zur Verbesserung der Spezifität des IgM-IC-ELISA**

Die Detektion von kreuzreaktiven Antikörpern ist gerade bei der Identifikation von Flavivirus-Infektionen ein weit verbreitetes Problem in serologischen Testsystemen [109]. Dies kann durch die Konkurrenz mit unmarkiertem Antigen im IC-ELISA verringert werden [86].

Bei dem in 2011 entwickelten IgG-IC-ELISA konnten Kreuzreaktionen bei der Detektion von DENV-Infektionen durch die Zugabe unmarkierter Dengue-ED3 Antigene der anderen Serotypen unterdrückt werden. Die kreuzreaktiven Antikörper binden das unmarkierte Antigen, welches im Überschuss hinzugegeben wird und können somit nicht mehr photometrisch gemessen werden. Dadurch konnte im ELISA zwischen den 4 Dengue-Serotypen bei Reiserückkehrern differenziert werden [86]. Dass eine Unterdrückung von falsch-positiv detektierten DENV infizierten Seren auch im WNV-IgM-IC-

ELISA mit dem WNV-EP möglich ist, konnte bereits in einigen Vorversuchen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch ist eine umfangreichere Untersuchung notwendig, um den Vorteil und die Wirtschaftlichkeit evaluieren zu können. Die Kompetition könnte dennoch zu der Verbesserung des IgM-IC-ELISA führen, wodurch das bekannte und häufig kritisierte Problem der Kreuzreaktionen in den vorhandenen WNV-ELISA-Systemen [109, 129] überholt werden könnte.

### **Einfluss von Störfaktoren auf den IgM-IC-ELISA**

Entscheidend bei der Entwicklung von Immunassays ist die Evaluierung von Störfaktoren, die Einfluss auf die Testergebnisse nehmen können. Die Spezifität/Sensitivität eines Testes hängt nicht nur von der Bindungsstärke des Antikörpers ab, sondern auch von der Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien und des Serums [135]. Zu den bekanntesten körpereigenen Interferenzen gehören natürliche Prozesse wie Hämolysen, Ikterus und Lipämie und im Speziellen für IgM-Assays der Rheumafaktor (RF) und eine hohe IgG-Konzentration.

Um fehlerhafte Ergebnisse durch RF und hohe IgG-Konzentrationen zu verhindern, werden RF/IgG-Absorbents eingesetzt [136, 137], wodurch IgG-Antikörper und Rheumafaktoren geblockt werden können. Eine hohe IgG-Konzentration kann durch die affineren IgG-Ak zu falsch-negativen Ergebnissen führen [92], RF im Serum können aufgrund der Bindung des RF (IgM-Ak) an virusspezifische IgG falsch-positive Ergebnisse generieren [137, 138].

Der CCHFV-IgM-IC-ELISA wurde mit RF/IgG-Absorbent vorinkubierten Seren getestet, jedoch führte dies zu einem erheblichen Signalverlust bei den untersuchten positiven Proben (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wurde 1993 in einem indirekten ELISA zur Detektion von anti-DENV IgM-Ak [136] ebenfalls beobachtet. Das RF-/IgG-Absorbent wurde deshalb nicht bei der Validierung des CCHFV-IgM-IC-ELISA verwendet. Die hohen Sensitivitäts- und Spezifitätswerte für den ELISA zeigen, dass bei den untersuchten Seren der Einsatz des Absorbents nicht notwendig scheint. Es wurden nur zwei gesunde Blutspenderseren im CCHFV-IgM-IC-ELISA falsch-positiv detektiert, diese enthielten nachweislich keinen Rheumafaktor. Bisher konnten jedoch falsch-positive Ergebnisse im IgM-IC-ELISA durch Seren die Rheumafaktor positiv, anti-CCHFV IgG positiv und anti-CCHFV IgM negativ sind nicht ausgeschlossen werden. Wenn ein Serum jedoch ein hohes Extinktionssignal im IgG-IC-ELISA und IgM-IC-ELISA zeigt, sollte zunächst getestet werden, ob das Serum Rheumafaktor positiv ist, da eine hohe IgM- und IgG-Konzentration unrealistisch ist.

Bei der Verwendung des RF/IgG-Absorbent im WNV-IgM-IC-ELISA mit WNV-ED3-Antigen konnte jedoch eine Sensitivitätserhöhung im Vergleich zu nicht hinzugegebe-

nem Absorbent erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit alle Ergebnisse im WNV-IgM-IC-ELISA mit WNV-ED3 unter Verwendung des RF/IgG-Absorbent ermittelt. Das WNV-ED3 ist das kleinste Antigen, das für den IgM-IC-ELISA bisher verwendet wurde; in der geringen Epitopenanzahl könnte die Ursache für den positiven Effekt des Absorbents liegen. Die affineren, virusspezifischen IgG könnten das WNV-ED3 schneller besetzen als die IgM-Ak, wodurch eine Bindung von virusspezifischen IgM-Ak an das Antigen durch die geringer Größe nicht mehr möglich wird. Eine Blockierung der IgG-Ak durch das RF/IgG-Absorbent verhindert diesen Effekt und ermöglicht die Bindung von virusspezifischen IgM-Ak an das WNV-ED3 und damit die anschließende Detektion.

Bei der Analyse des störenden Einflusses von Hämolyse, Ikterus und Lipämie im CCHFV-IgM-IC-ELISA zeigte sich nur bei der Untersuchung der hämolytischen Probe ein statistisch signifikanter Unterschied zur unbehandelten Probe (Abb. 29). Die Hämolyse gehört zu den am häufigsten auftretenden Störfaktoren [139]. Für die Evaluierung des Hämoglobineinflusses wurde 10 mg/ml Hämoglobin zum Serum hinzugegeben, sodass die Serumprobe eine rötliche Färbung aufwies. Eine Serumprobe mit dieser Art von Verfärbung würde für die Diagnostik nicht mehr eingesetzt werden, weil kein vertrauenswürdigeres Ergebnis mehr gewährleistet werden kann. Bei der positiven Probe handelt es sich um eine sehr geringe Signalabnahme, die in diesem Fall zu keinem falsch-negativen Ergebnis führte. Die geringe Signalerhöhung bei der negativen Probe könnte auch im Rahmen der Messungengenauigkeit des Photometers liegen. Die Diagnose von hämolytischen Proben im IgM-IC-ELISA sollte jedoch trotzdem unter Vorbehalt getroffen werden.

Die Analyse ausgewählter Störfaktoren im IgM-IC-ELISA zeigt, dass eine detailliertere Betrachtung zur endgültigen Einflussevaluierung von Störfaktoren notwendig ist. Eine große Herausforderung ist gut charakterisierte Seren hierfür zu finden, um die Störfaktoren, insbesondere Rheumafaktor-positive Seren, genau untersuchen zu können.

### **Untersuchung von Seren mit tierischem Ursprung**

Ein wesentlicher Vorteil des IC-ELISA ist die Organismus unabhängige Detektion von Virusinfektionen, d.h. humane und tierische Serumproben können parallel in einem ELISA-Ansatz getestet werden [85]. Wie wichtig diese Eigenschaft ist, zeigt sich bei CCHFV-Infektionen. Wildtiere und auch Nutztiere können durch einen Zeckenbiss mit dem CCHFV infiziert werden, wodurch das Virus über Blut oder Gewebeflüssigkeiten auf den Menschen übertragen werden kann. Eine CCHFV-Infektion von Tieren ist jedoch anhand von Krankheitssymptomen nicht zu erkennen, wodurch diese meist uner-

kannt bleiben [1, 11]. Dies birgt eine hohe Ansteckungsgefahr für den Menschen im Umgang mit Nutztieren z.B. beim Schlachten.

Ein kommerziell erhältliches Testkit zur Detektion von tierischen CCHFV-Infektionen existiert bisher noch nicht [140, 141]. Die Untersuchung von Verlaufsseren aus dem Jahr 2010-2014 von Zeburindern einer Herde aus Kamerun zeigte, dass mit dem IgM-IC-ELISA CCHFV-Infektionen auch bei Tieren nachweisbar sind (Abb. 32). Dadurch könnte der IgM-IC-ELISA in Zukunft zur Identifikation von CCHFV-Infektionen in Menschen und Tieren parallel eingesetzt werden.

### 4.3 Weiterentwicklung zum Schnelltest: *proof-of-principle*

Testsysteme, die schnelle Diagnosen und kein geschultes Personal voraussetzen, sind heutzutage immer mehr gefragt. Dadurch besteht die Möglichkeit, den Patienten direkt spezifisch zu therapieren. Zusätzlich ist durch die einfache Handhabung der Einsatz außerhalb von Krankenhäusern und speziellen Laboren möglich. Dies ist vor allem bei Epidemien ein entscheidender Faktor [51]. Schnellteste erfüllen diese Kriterien der patientennahen Sofortdiagnostik, wodurch der Fokus immer mehr auf diese Art von Testsystemen gelegt wird [142].

Innerhalb dieser Arbeit wurde geprüft, ob die spezifische IgM-IC-Bindung durch das His-Fc $\mu$ R-Ig auch in ein Schnelltestformat umgewandelt werden kann. Mit Hilfe von His-Fc $\mu$ R-Ig beschichteten Latexpartikeln konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IgM-IC außerhalb des ELISA-Formats funktioniert. His-Fc $\mu$ R-Ig beschichtete Latexpartikel aggregieren sichtbar, wenn diese mit einem anti-CCHFV IgM positivem Serum und dem CCHFV-NP Antigen inkubiert werden. Eine alleinige Inkubation mit dem Serum führt zu keiner Aggregatbildung (Abb. 33). Die Latex Partikel wurden bereits in einem Schnelltestformat zur Detektion von IgG-/IgM-Ak von DENV- und CHIKV-Infektionen in einem Assay eingesetzt [143]. Die Etablierung eines Schnelltestes auf Basis des anti-human IgM-Ak, das Capture-Molekül des  $\mu$ -Capture-ELISA, ist nicht möglich, da bei der Zugabe von IgM-haltigem Serum es zur sofortigen Antigen-unabhängigen Aggregation der Latex Partikel kommt (Abb. 33 A,B). Daher ist nur bei dem His-Fc $\mu$ R-Ig das Potential vorhanden, das ELISA-System in einen visuell auswertbaren Schnelltest umzuwandeln. Die Inkubation von bislang 4 h bis zur visuellen Betrachtung der Latexaggregate konnte in einigen Vorversuchen bis auf wenige Minuten reduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Charakterisierung der Detektion von IgM-IC in einem Schnelltestformat muss jedoch hinsichtlich Sensitivität und Spezifität genauer evaluiert werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind ein erster Schritt zu Entwicklung eines Schnelltestes, der

darauf aufbauend weiterentwickelt und anschließend hinsichtlich seines Potential in der Virusdiagnostik beurteilt werden muss.

# Anhang

Tabellarische Übersicht der wichtigsten Informationen (u.a. Proteinsequenz, Molekulargewicht) über die verwendeten rekombinanten Proteine:

rek.Proteine	Proteinsequenz	Molekulargewicht kDa	pI
CCHFV-NP	MAHHHHHHMSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEPNLPYYIDGDVKLTQSMIIIRYADKHNMLGGCPKERASEISMLEGA- FELGLEPNLPYYIDGDVKLTQSMIIIRYADKHNMLGGCPKERASEISMLEGA- VLDIRYGVSRVIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMFLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKY IAWPLQGWQATFGGGDHP- KSDLSSGLEVLVFGPMPENKIEVNSKDEMKNWFEEFKKGN GLVDFTFTNSYFCESVPLDRFVFMASATDDAQKDSIYASALVEATKFCAPIYECA- WASSTGIVKKGLEWFEKNAGTIKSWDESYTELVKVEVPKIEQLSNYQAAALKWRKDIGFRVNANTAALSINKVLAEKYVPGIEIVMSVKEMLS DMIRRRNLILNRGGDENPRGPVSREH- VEWCREFVKGKYMFAFNPPWGDINKSGRSGIALVATGLAKLAETEGKGVFDEAKKTVEALNGYLDKHKDEVDKASADSMITN LKHKIAKAQELYKNSSALRAQGAQIDTVFSSYYWLYKA- GVTPTDFTPTVSQFLFELGKQPRGTKKMKKALLSTPMKWGKLYELFADDSFQQRNRYMHPAVLTAGRIS EMGVCFGTIPVANPDDAALGSGHTKSILNLRNTTETNPPCAKTIVKLFQIKT- GFNIQDMDIVASEHLLHQSLVGVKQSPFQANAYNVKGNATSANI*	54 (ohne Tag) 82 (mit Tag)	9,4 8,7
WNV-EP	MGFNCLGMSNRDFLEGVSGATWVDLVLEGDSCVTIMSKDKPTIDVKMMNMEAANLAEVSYCYLATVSDLSTKAACPTMGEAHNDKRAPAFVCRQGVVDRGWGNG- LAEVSYCYLATVSDLSTKAACPTMGEAHNDKRAPAFVCRQGVVDRGWGNG- CGLFGKGSIDTCAKFACTKAIGRILKENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQVQAGTQAGRSITPAAPSYTLKGEYGEVTVDCPRSGIDTNAVYVMTGKTFVLR EWFMDLNLPS- SAGSTVWRNRETLMEFEPPHATKQSVIALGSQEGALHQAAGAIPVEFSSNTVKLTSGLH- KCRVKMEKQLKGTTYGVCSKAFKFLGTPADTGHGTVLELQYGTGDPCKVPISSVASLNDLTPVGRVTVNPFVSVATANAKVLEIEPPFGDSYIVVGRGEQINHHWHKS*	43	6,42
WNV-ED3	MGHHHHHHHHSSGRLVLFQGGPHMKLEFLKGTTYGVCSKAFKFLGTPADTGHGTVLELQYGTGDPCKVPISSVASLNDLTPVGRVTVNPFVSVATANAKVLEIEPPFGDSYIVVGR GEQINHHWHKS*	14,8 (mit Tag) 12 (ohne Tag)	7,3 7,1
ZIKV-NS1	MGDVGCSVDFFSKKETRCGTGVFIYNDVEAWRDYKYHPDPRRLAAAVKQAWEEGICGISSVSRMENIMWKSVEGELNAILEENGVQLTVVVGSVKNPMWRG- WEEGICGISSVSRMENIMWKSVEGELNAILEENGVQLTVVVGSVKNPMWRGPQRLPVPVNELPHGWKAWGKSYFVRAAKTNNFVVDGDTLKECPLHRAWNSFLVED- PQRLPVPVNELPHGWKAWGKSYFVRAAKTNNFVVDGDTLKECPLHRAWNSFLVEDHGFVFTSVWLKVRDYSLECDPAVIGTAVKGREAAHSDLGWIESE- HGFVFTSVWLKVRDYSLECDPAVIGTAVKGREAAHSDLGWIESEKNDTWRLKRAHLIEMKTCWPKSHTLWTDGVEESDLIIPKSLAGPLSHHNTREGYR- KNDTWRLKRAHLIEMKTCWPKSHTLWTDGVEESDLIIPKSLAGPLSHHNTREGYR- TQVKGPHWSEELIRFEECPGTKVYVEETCGTRGSLRSTTASGRVIEEWCCRECTMPPLSFRAKDGCVYGMIEIRPRKEPESNLVRSMTA*	40	8,24
His-FcμR-Ig**	MGHHHHHHHHSSGHIEGRHMGLEV- LFGPGRILPEVKVEGELGGSVTIKCPLPEMHVRIYLCREMAGSGTCGTVVSTTFIKAIEYKGRVTLKQYPRKNLFLVEVTQLTESDSGVYACGAGMNTDRGKTQKVTNLVHS*	11,9 (ohne Tag) 15,4 (mit Tag)	8,99 8,74

Die grüne Markierung entspricht der Proteinsequenz der Proteine

Ohne His-Tag (HHHHHHHHHH)

Ohne GST (MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEPNLPYYIDGDVKLTQSMIIIRYADKHNMLGGCPKERASEISMLEGA-

FELGLEPNLPYYIDGDVKLTQSMIIIRYADKHNMLGGCPKERASEISMLEGA-

VLDIRYGVSRVIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMFLYDA-

LDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDL)

Mit gespaltener 3C-Proteaseschnittstelle (LEVLFG GP)

\*\*Die Proteine wurden ohne Abspaltung des His-Tag verwendet

Tabellarische Übersicht der wichtigsten Informationen zur Klonierung der verwendeten rekombinanten Proteine:

Konstrukt	Template	PCR-Primer	Sequenzierungs-primer	Fragment-Größe (bp)	Restriktion (Fragment)	Restriktion (Vektor)	Protein
<i>pJC45-WNV-EP</i>	<i>pJC45-His<sub>10</sub>-3C-WNV(NY)-E-ecto#1</i>	#124 #125	#9 #52	1237	n/a <i>In-Fusion® Cloning</i>	<i>BamHI/NcoI</i> ( <i>pJC45</i> )	WNV-EP
<i>pJC45-His<sub>10</sub>-3C-WNV-ED3</i>	<i>pGEM-T-WNV-ED3</i>	#38 #39	#9	331	EcoRI/BamHI Klassische Klonierung	<i>BamHI/NcoI</i> ( <i>pJC45-His<sub>10</sub>-3C</i> )	WNV-ED3
<i>pJC45-ZIKV-NS1</i>	<i>pGEM-T-ZIKV-NS1</i>	#142 #141	#9 #52	1093	n/a <i>In-Fusion® Cloning</i>	<i>BamHI/NcoI</i> ( <i>pJC45</i> )	ZIKV-NS1
<i>pJC45-His<sub>10</sub>-Xa-3C-FcγR-Ig</i>	<i>pGEM-T-HsFcγR</i>	#119 #120	#9	360	n/a <i>In-Fusion® Cloning</i>	<i>SmaI</i> ( <i>pJC45-3C-His-CD32</i> )	His-FcγR-Ig

Informationsübersicht über die verwendeten CCHFV, ZIKV und WNV anti-IgM positiven Proben

#pos	Patienten- nummer	frühe Probe						späte Probe						rekonvaleszente Probe					
		TaK dao	PCR	IgM IIFT	IgG IIFT	IgM-IC- ELISA	IgG-IC- ELISA	TaF dao	PCR	IgM IIFT	IgG IIFT	IgM-IC- ELISA	IgG-IC- ELISA	TaF dao	PCR	IgM IIFT	IgG IIFT	IgM-IC- ELISA	IgG- IC- ELISA
CCHFV	1	0 6	pos	pos	pos	pos	neg	9 15	neg	pos	pos	pos	pos						
	2	8 14	amb	pos	pos	pos	pos	3 17	neg	pos	pos	pos	pos	<1 a 484	nt	pos	pos	pos	pos
	3	4 13	neg	pos	pos	pos	pos	23 36	neg	pos	pos	pos	pos	<1 a 476	nt	pos	pos	pos	pos
	4	0 2	pos	neg	pos	neg	neg	9 11	neg	pos	pos	pos	pos						
	5	0 8	nt	pos	pos	pos	neg	13 21	neg	pos	pos	pos	pos	<1 a 506	nt	pos	pos	pos	pos
	6	0 3	pos	neg	neg	neg	neg	22 25	neg	pos	pos	pos	pos						
	7	0 2	pos	neg	neg	neg	neg	6 8	pos	pos	pos	pos	pos	<1 a 469	nt	pos	pos	pos	pos
	8	0 5	pos	pos	pos	pos	neg	10 15	neg	pos	pos	pos	pos						
	9	0 2	pos	neg	neg	pos	neg	10 12	neg	pos	pos	pos	pos						
	10	0 7	amb	pos	pos	pos	pos	19 26	nt	pos	pos	pos	pos						
	11	0 4	pos	neg	neg	neg	neg	7 11	nt	pos	pos	pos	pos						
	12	0 7	pos	pos	pos	pos	neg	9 16	neg	pos	pos	pos	pos						
	13	1 3	pos	neg	neg	neg	neg	15 18	nt	pos	pos	pos	pos						
	14	1 8	neg	pos	pos	pos	pos	10 17	nt	pos	pos	pos	pos						

dao: Tag nach Beginn der Symptome; TaK: Tag nach Ankunft im Krankenhaus; TaF: Tag nach Abnahme der frühen Probe, a: Jahr

#pos	Patientennummer	Alter	Gender	frühe Probe					späte Probe			
				Tag nach Beginn der Symptome	PCR	IgM Euroimmun	IgG Euroimmun	IgM-IC-ELISA	Tag nach Beginn der Symptome	IgM Euroimmun	IgG Euroimmun	IgM-IC-ELISA
ZIKV	1	18	F	1	pos	neg	neg	neg	8	pos	pos	pos
	2	45	F	1	pos	neg	pos	neg	8	neg	pos	pos
	3	35	F	1	pos	neg	pos	neg	8	neg	pos	pos
	4	33	F	1	pos	pos	pos	neg	14	pos	pos	pos
	5	58	F	1	pos	neg	pos	neg	11	neg	pos	pos
	6	27	F	1	pos	neg	pos	neg	8	neg	pos	pos
	7	45	F	2	pos	neg	neg	neg	15	pos	pos	pos
	8	58	M	2	pos	neg	pos	neg	5	neg	pos	pos
	9	56	M	2	pos	neg	neg	neg	7	neg	pos	pos
	10	18	M	2	pos	neg	neg	neg	5	pos	pos	pos
	11	48	F	2	pos	neg	ind.	neg	10	neg	pos	pos
	12	32	F	2	pos	neg	pos	neg	6	neg	pos	pos
	13	39	M	2	pos	neg	pos	pos	9	neg	pos	pos
	14	54	F	2	pos	neg	neg	neg	9	pos	pos	pos
	15	36	F	2	pos	neg	neg	neg	7	pos	pos	pos

ZIKV	16	24	M	2	pos	neg	neg	neg	15	pos	pos	pos
	17	30	F	2	pos	neg	pos	neg	10	neg	pos	pos
	18	54	F	3	pos	ind.	pos	neg	6	neg	pos	pos
	19	11	M	3	pos	pos	ind.	pos	5	pos	pos	pos
	20	55	M	3	pos	neg	pos	pos	15	neg	pos	pos
	21	23	F	3	pos	neg	neg	neg	10	pos	pos	pos
	22	26	F	3	pos	neg	pos	neg	11	neg	pos	pos
	23	47	M	3	pos	neg	pos	neg	7	neg	pos	pos
	24	42	F	3	pos	neg	pos	neg	9	neg	pos	pos
	25	36	M	3	pos	neg	neg	neg	6	pos	neg	pos
	26	56	F	4	pos	neg	pos	neg	15	neg	pos	pos
	27	26	F	4	pos	neg	pos	neg	12	pos	pos	pos
	28	39	M	4	pos	neg	neg	neg	7	pos	neg	pos

#pos	Patientennummer	Tag nach Beginn der Symptome	PRNT	IgM IFT	IgG IFT	IgM-ELISA Focus Kit	IgG-ELISA Focus Kit	$\mu$ -Capture ELISA EP-Antigen	$\mu$ -Capture ELISA ED3-Antigen	IgM-IC-ELISA EP-Antigen	IgM-IC-ELISA ED3-Antigen
WNV	1	8	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	2	11	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	3	21	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos
	4	8	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	5	51	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos
	6	22	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	7	28	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	8	22	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	9	35	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	10	27	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	11	28	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	12	24	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	13	17	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	14	57	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
	15	36	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	16	26	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos



## Literaturverzeichnis

1. Löscher, T. and G. Burchard, *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: mit Reise-und Migrationsmedizin*. 4 ed. 2010: Thieme.
2. WHO, *An R&D Blueprint for Action to Prevent Epidemics*. 2015.
3. Karabatsos, N., *International catalogue of arthropod-borne viruses*. 1985, San Antonio, Tex. : Published for the Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses by the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. p. 1147.
4. Doerr, H. and W. Gerlich, *Medizinische Virologie*. 2 ed. 2009: Thieme.
5. Wilder-Smith, A., et al., *Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017. **17**(3): p. e101-106.
6. Gould, E.A. and S. Higgs, *Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2009. **103**(2): p. 109-121.
7. Modrow, S., et al., *Molekulare Virologie*. 3 ed. 2010: Springer.
8. Vonesch, N., et al., *Climate change, vector-borne diseases and working population*. *Ann Ist Super Sanita*, 2016. **52**(3): p. 397-405.
9. Ergönül, Ö., *Crimean-Congo haemorrhagic fever*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006. **6**(4): p. 203-214.
10. Becker, N., et al., *Stechmücken als Überträger exotischer Krankheitserreger in Deutschland*. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2014. **57**(5): p. 531-540.
11. Shapshak, P., et al., *Global Virology I*. 1 ed. 2015: Springer.
12. Reiter, P. and D. Sprenger, *The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1987. **3**(3): p. 494-501.
13. Goddard, J., *Infectious Diseases and Arthropods*. 2 ed. 2009: Humana Press.
14. Deutschland, U. *Asiatische Tigermücke*. 2015; Available from: Kurzlink: <http://bit.ly/1nVNTwr>.
15. Gubler, D.J., *The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems*. *Achieves of Medical Research* 2002. **33**(4): p. 330-342.
16. Slingenbergh, J., et al., *Ecological sources of zoonotic diseases*. *Rv Sci Tech.*, 2004. **23**(2): p. 467-484.
17. CDC. *Areas with Risk of Zika*. 2016; Available from: <https://www.cdc.gov/zika/geo/>.
18. Weaver, S.C., *Emergence of Epidemic Zika Virus Transmission and Congenital Zika Syndrome: Are Recently Evolved Traits to Blame?* *MBio*, 2017. **8**(1).
19. Chancey, C., et al., *The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus*. *BioMed Research International*, 2014. **2015**: p. 20.
20. WHO. *Crimean-Congo haemorrhagic fever*. 2008; Available from: [http://www.who.int/csr/disease/crimean\\_congoHF/en/](http://www.who.int/csr/disease/crimean_congoHF/en/).
21. Mertens, T., O.A. Haller, and H.-D. Klenk, *Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten*. 2 ed. 2004: Urban&Fischer.

22. Chambers, T. and T. Monath, *The Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity*. Vol. 60. 2003. 486.
23. *Zika-Virus-Infektionen*, Euroimmun AG. 2017.
24. Shu, P.-Y., et al., *Dengue NS1-specific antibody response: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever*. Journal of Medical Virology, 2000. **62**(2): p. 224-232.
25. Kassim, F., et al., *Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection*. Southeast Asian J trop Med Public Health, 2011. **42**(3): p. 562-569.
26. Ferguson, N.M., et al., *Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment*. Science, 2016. **353**(6303): p. 1033-1036.
27. WHO, *Dengue vaccine: WHO position paper-July 2016* Weekly epidemiological record, 2016. **91**: p. 349-364.
28. Guy, B., et al., *A recombinant live attenuated tetravalent vaccine for the prevention of dengue*. Expert Rev Vaccines, 2017. **16**(7): p. 1-13.
29. ViralZone. Available from: <http://viralzone.expasy.org/>.
30. *West-Nil-Virus*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2012. **55**(8): p. 1024-43.
31. Jungbauer, C., et al., *West Nile virus lineage 2 infection in a blood donor from Vienna, Austria, August 2014*. J Clin Virol, 2015. **64**: p. 16-19.
32. Stiansy, K., S.W. Aberle, and F. Heinz, *Retrospective identification of human cases of West Nile virus infection in Austria (2009 to 2010) by serological differentiation from Usutu and other flavivirus infections*. Eurosurveillance, 2013. **18**(43).
33. Roehrig, J.T., *West Nile Virus in the United States - A Historical Perspective*. Viruses, 2013. **5**(12): p. 3088-3108.
34. Pauli, G., et al., *West Nile Virus*. Transfus Med Hemother, 2013. **40**(4): p. 265-284.
35. Hayes, E.B. and D.J. Gubler, *West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 181-194.
36. Wikan, N. and D.R. Smith, *Zika virus: history of a newly emerging arbovirus*. The Lancet Infectious Diseases, 2016. **16**(7): p. e119-126.
37. Ploudre, A.R. and E.M. Bloch, *A Literature Review of Zika Virus*. Emerging Infectious Diseases, 2016. **22**.
38. Sakkas, H., V. Economou, and C. Papadopoulou, *Zika virus infection: Past and present of another emerging vector-borne disease*. J Vector Borne Dis, 2016. **53**(4): p. 305-311.
39. Petersen, L.R., et al., *Zika Virus*. N Engl J Med, 2016. **374**(16): p. 1552-1563.
40. Ventura, C., et al., *Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly*. Lancet, 2016. **387**(10015): p. 228.
41. Araujo, L.M., M.L. Ferreira, and O.J. Nascimento, *Guillain-Barre syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil*. Arq Neuropsiquiatr, 2016. **74**(3): p. 253-255.
42. WHO. *The History of Zika-Virus*. Available from: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/history/en/>.
43. Honig, J.E., J.C. Osborne, and S.T. Nichol, *The high genetic variation of viruses of the genus Nairovirus reflects the diversity of their predominant tick hosts*. Virology, 2004. **318**(1): p. 10-16.

44. Wang, W., et al., *Structural and Functional Diversity of Nairovirus-Encoded Nucleoproteins*. J Virol, 2015. **89**(23): p. 11740-11749.
45. Kuhn, J.H., et al., *Genomic Characterization of the Genus Nairovirus (Family Bunyaviridae)*. Viruses, 2016. **8**(6).
46. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields Virology*. 5 ed. Vol. 1. 2007: Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams& Wilkins.
47. Papa, A., et al., *Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever*. J Clin Virol, 2015. **64**: p. 137-143.
48. Mousavi-Jazi, M., et al., *Healthy individuals' immune response to the Bulgarian Crimean-Congo hemorrhagic fever virus vaccine*. Vaccine, 2012. **30**(44): p. 6225-6229.
49. Domingo, C., et al., *Molecular Diagnosis of Flaviviruses*. Future Virology, 2011. **6**(9): p. 1059-1074.
50. Neumeister, B. and O. Böhm, *Klinkleitfaden Labordiagnostik*. 4 ed. 2008: Urban & Fischer Verlag/Elsevier
51. Caliendo, A.M., et al., *Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases*. Clin Infect Dis, 2013. **57** (3): p. 139-170.
52. Litzba, N., *Etablierung und Evaluierung serologischer Teste zur Detektion hochpathogener Arboviren*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2011, Freie Universität Berlin.
53. Thome-Kromer, B., *Konsequenzen des Wechsels der vorgesehenen Anwendung von Medizinprodukten und In-vitro-Diagnostika vom Mensch zum Tier in Deutschland/Europa*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2015, Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
54. IHK, *CE-Kennzeichnung von Medizinprodukten*. 2016.
55. Union, R.d.E., *Verordnung des europäischen Parlaments und des Rates über In-vitro-Diagnostika und zur Aufhebung der Richtlinie 98/79/EG und des Beschlusses 2010/227/EU der Kommission*. 2017.
56. Union, K.d.E., *Richtlinie über In-vitro-Diagnostika-IVDD (98/79/EG)*. 2017.
57. Smith, D.R., *Waiting in the wings: The potential of mosquito transmitted flaviviruses to emerge*. Critical Reviews in Microbiology, 2016. **43**(4): p. 405-422.
58. Lübeck, E.A.a., *Pressemitteilung: Erste kommerzielle Antikörper-Tests zur Zika-Virus-Diagnostik ab sofort verfügbar*. 29. Januar 2016.
59. Charrel, R.N., et al., *Background review for diagnostic test development for Zika virus infection*. Bull World Health Organ, 2016. **94**(8): p. 574-584D.
60. Dairon, M., *Fc receptor biology*. Annu. Rv. Immuno., 1997. **15**: p. 203-234.
61. Jacobino, S., et al., *Fc Receptors*. eLS. John Wiley&Sons, Ltd:Chichester, 2013.
62. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. 3 ed. 2011: Spectrum.
63. Rosales, C. and E. Uribe-Querol, *Fc receptors: Cell activators of antibody functions*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2013. **4**(4): p. 21-33.
64. Raghavan, M. and P.J. Bjorkman, *Fc receptors and their interactions with immunoglobulins*. Annu.Rev.Dev.Biol., 1996. **12**: p. 181-220.

65. Takai, T., *Roles of Fc receptors in autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 580-592.
66. Abbas, A.K., A.H. Lichtmann, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. 8 ed. 2014: Elsevier Saunders.
67. Neumann, J., *Immunbiologie- Eine Einführung*. 2008: Springer.
68. Rosales, C., *Fcγ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses*. Front Immunol, 2017. **8**(280).
69. Hajela, K., *Structure and Function of Fc Receptors*. Biochemical Education, 1991. **19**(2).
70. Lapke, N., *Der Einfluss von anti-FcμR Antikörpern auf die CD8+ T-Zell-Antwort im Vakzinierungs-und Infektionsmodell der experimentellen Malaria*, in *Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften*. 2013, Universität Hamburg.
71. Siberil, S., et al., *Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences*. Immunol Lett, 2006. **106**(2): p. 111-118.
72. Hogarth, P.M. and G.A. Pietersz, *Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond*. Nature Reviews, 2012. **11**(4): p. 311-331.
73. Alt, F.W., *Advances in Immunology*. 1 ed. Vol. 96. 2007: Elsevier Science.
74. Shima, H., et al., *Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM*. Int Immunol, 2010. **22**(3): p. 149-156.
75. Kubagawa, H., et al., *Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans*. J Exp Med, 2009. **206**(12): p. 2779-2793.
76. Klimovich, V.B., *IgM and its receptors: structural and functional aspects*. Biochemistry, 2010. **76**(5): p. 534-549.
77. Vire, B., A. David, and A. Wiestner, *TOSO, the Fcμ receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation*. The Journal of Immunology, 2011. **187**(8): p. 4040-4050.
78. Hitoshis, Y., et al., *Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells*. Immunity, 1998. **8**(4): p. 461-471.
79. Ouchida, R., et al., *FcμR (Toso/Faim3) is not an inhibitor of Fas-mediated cell death in mouse T and B cells*. blood, 2013. **121**(12): p. 2368-2370.
80. Honjo.K., H. Kubagawa, and Y. Kubagawa, *Is Toso an antiapoptotic protein or an Fc receptor for IgM?* BLOOD, 2012. **119**(7): p. 1789-1790.
81. Choi, S.-C., et al., *Mouse IgM Fc receptor, FCMR, promotes B cell development and modulates antigen-driven immune responses*. J Immunol., 2013. **190**(3): p. 987-996.
82. Kubagawa, H., et al., *Supplement material, Kubagawa et al., 2009*. J Exp Med, 2009. **206**(12).
83. Kubagawa, H., et al., *The long elusive IgM Fc Receptor, FcμR*. I Clin Immunol, 2014. **34**: p. 35-45.
84. Kazuhito, H., et al., *Unique Ligand-Binding Property of the Human IgM Fc Receptor (FcμR)*. J Immunol., 2015. **194**(4): p. 1975-1982.
85. Schmitz, H., M. Gabriel, and P. Emmerich, *Specific detection of antibodies to different flaviviruses using a new immune complex ELISA*. Med Microbiol Immunol, 2011. **200**(4): p. 233-239.

86. Emmerich, P., A. Mika, and H. Schmitz, *Detection of Serotype-Specific Antibodies to the Four Dengue Viruses Using an Immune Complex Binding (ICB) ELISA*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(12): p. e2580.
87. Rackow, A., *Entwicklung eines serologischen Tests zur Detektion von IgM-Antikörpern gegen das West-Nil-Virus*. 2014, TU Braunschweig.
88. *Kit Manual: Anti-Zika Virus ELISA (IgM)*, Euroimmun AG. 2016.
89. Vector-Best, *Kit Manual: Vectorcrimean-CHFV-IgM*. 2012.
90. *Kit Manual: West Nile Virus IgM Capture DxSelect™*, Focus Diagnostics. 2012.
91. Scientific, T.F. *Overview of ELISA*. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>.
92. Cohen, I.R., L.C. Norins, and A.J. Julian, *Competition between, and effectiveness of, IgG and IgM antibodies in indirect fluorescent antibody and other tests*. The Journal of Immunology, 1967. **98**(1): p. 143-149.
93. Green, M.R. and J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4 ed. Vol. 1-3. 2012, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
94. Novy, R. and B. Morris, *Use of glucose to control basal expression in the pET System*. inNovations, 2001.
95. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1975. **72**(1-2): p. 248-254.
96. Burgess, R.R. and M.P. Deutscher, *Guide to protein purification*. 2. ed. ed. Methods in enzymology. 2009, Amsterdam u.a.: Elsevier, Acad. Press.
97. Luca, V.C., et al., *Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein*. J Virol, 2012. **86**(4): p. 2337-2346.
98. Muerhoff, A.S., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant envelope protein expressed in COS-1 and Drosophila S2 cells for detection of West Nile virus immunoglobulin M in serum or cerebrospinal fluid*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(4): p. 651-657.
99. Hogrefe, W.R., et al., *Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(10): p. 4641-4648.
100. Emmerich, P., et al., *Early serodiagnosis of acute human Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections by novel capture assays*. J Clin Virol, 2010. **48**(4): p. 294-295.
101. Sondermann, P. and U. Jacob, *Human Fcγ receptor IIb expressed in Escherichia coli reveals IgG binding capability*. Biol.Chem., 1999. **380**(6): p. 717-721.
102. Wenig, K. and P. Sondermann, *Purification, crystallization and X-ray diffraction analysis of the extracellular part of the human Fc receptor for IgA, FcαRI (CD89)*. Acta Cryst., 2003. **D59**: p. 2247-2250.
103. Hamburger, A.E., A.P. West, Jr., and P.J. Bjorkman, *Crystal structure of a polymeric immunoglobulin binding fragment of the human polymeric immunoglobulin receptor*. Structure, 2004. **12**(11): p. 1925-1935.

104. Sondermann, P., R. Huber, and U. Jacob, *Crystal structure of the soluble form of the human Fcγ-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution*. The EMBO Journal, 1999. **18**(5): p. 1095-1103.
105. Gibbs, J., *Immobilization Principles-Selecting the Surface, ELISA Technical Bulletin-No.1*. Corning Incorporated Life Sciences.
106. Bremond, J. and M. Plebani, *IVD industry role for quality and accreditation in medical laboratories*. Clinica Chimica Acta, 2001. **309**(2): p. 167-171.
107. Gammie, A.J., *For the proposition: for the diagnosis of viral infections, commercial assays provide more reliable results than do in-house assays*. Rev Med Virol, 2008. **18**(2): p. 73-76.
108. Glick, M.S., *Loss of antigen-antibody affinity with storage of antiserum at -20c*. I Clin Endocrinol Metab, 1973. **37**(3): p. 461-462.
109. Sanchini, A., et al., *Second international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(4): p. e2184.
110. Rastogi, M., N. Sharma, and S.K. Singh, *Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein*. Virol J, 2016. **13**(131).
111. Shu, P.-Y., et al., *Potential Application of Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Seroepidemiologic Study of Dengue Virus Infection: Correlation of Results with those of the Plaque Reduction Neutralization Test*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(5): p. 1840-1844.
112. Shu, P.-Y., et al., *Antibody to the nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus: potential application of mAb-based indirect ELISA to differentiate infection from vaccination*. Vaccine, 2001. **19**(13-14): p. 1753-1763.
113. Cleton, N.B., et al., *Spot the Difference-Development of a Syndrome based Protein Microarray for Specific Serological Detection of Multiple Flavivirus Infections in Travelers*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(3): p. e0003580.
114. Steinhagen, K., et al., *Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016*. Eurosurveillance, 2016. **21**(50).
115. Alcon, S., et al., *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(2): p. 376-381.
116. Kuno, G., *Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans*. Advances in virus research, 2003. **61**: p. 3-65.
117. Granger, D., et al., *Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences*. J Clin Microbiol, 2017. **55**(7): p. 2127-2136.
118. Huzly, D., et al., *High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses*. Euro Surveill, 2016. **21**(16).
119. L'Huillier, A.G., et al., *Evaluation of Euroimmun Anti-Zika virus ELISAs (IgM & IgG) for Zika virus serologic testing*. J Clin Microbiol, 2017.

120. Van Esbroeck, M., et al., *Letter to the editor: Specificity of Zika virus ELISA: interference with malaria*. Euro Surveill, 2016. **21**(21).
121. Bludau, H.C., *Evaluation of diagnostic kits and reagents-a viewpoint from the industry*. Clinical and Diagnostic Virology, 1996. **5**(2-3): p. 147-155.
122. Mayer, K.C. *Sensitivität und Spezifität*. Glossar]. Available from: [http://www.neuro24.de/show\\_glossar.php?id=1557](http://www.neuro24.de/show_glossar.php?id=1557).
123. Kommission Methoden und Qualitätssicherung in der, U., *Guidelines for diagnostic validity. Report on the Commission for Methods and Quality Assurance in Environmental Medicine*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2008. **51**(11): p. 1353-6.
124. Waggoner, J.J. and B.A. Pinsky, *Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat*. J Clin Microbiol, 2016. **54**(4): p. 860-867.
125. Bente, D.A., et al., *Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity*. Antiviral Res, 2013. **100**(1): p. 159-189.
126. Appannanavar, S. and B. Mishra, *An Update on Crimean Congo Hemorrhagic Fever*. J Glob Infect Dis., 2011. **3**(3): p. 285-292.
127. Charrel, R.N., et al., *Tick-borne virus diseases of human interest in Europe*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(12): p. 1040-1055.
128. Scholzen, A. and R.W. Sauerwein, *How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in Plasmodium infection*. Trends Parasitol, 2013. **29**(5): p. 252-262.
129. Niedrig, M., et al., *First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection*. BMC Infect Dis, 2007. **7**(72).
130. Malan, A.K., et al., *Evaluations of commercial West Nile virus immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme immunoassays show the value of continuous validation*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(2): p. 727-733.
131. Vanhomwegen, J., et al., *Diagnostic Assays for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(12): p. 1958-1965.
132. Marriott, A.C., et al., *Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein*. Journal of General Virology, 1994. **75**(Pt9): p. 2157-2161.
133. Vojdani, A., *Detection of IgE, IgG, IgA and IgM antibodies against raw and processed food antigens*. Nutrition & Metabolism, 2009. **6**(22).
134. Castro, C. and M. Gourley, *Diagnostic Testing and Interpretation of Tests for Autoimmunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 ): p. 238-247.
135. Schiettecatte, J., E. Anckaert, and J. Smits, *Interference in Immunoassays*. InTech 2012.
136. Kheong, C.T., et al., *Pretreatment of Test Sera with Three Kinds of IgG-Adsorbents Did Not Improve Sensitivity in the Indirect ELISA to Detect Anti-Dengue IgM Antibodies*. Trop. Med., 1993. **35**(2): p. 65-73.
137. Meurman, O.H. and B.R. Ziola, *IgM-class rheumatoid factor interference in the solid-phase radioimmunoassay of rubella-specific IgM antibodies*. Journal of Clinical Pathology, 1978. **31**(5): p. 483-487.
138. Ismail, A.A.A., et al., *Wrong biochemistry results: two case reports and observational study in 5310 patients on potentially misleading thyroid-stimulating hormone and gonadotropin immunoassay results*. Clin Chem, 2002. **48**(11): p. 2023-2029.

139. Dimeski, G., *Interference Testing*. Clin Biochem Rev, 2008. **29**(1): p. 43-48.
140. Schuster, I., et al., *Sheep and goats as indicator animals for the circulation of CCHFV in the environment*. Exp Appl Acarol, 2016. **68**(3): p. 337-346.
141. Mertens, M., et al., *Circulation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in the former Yugoslav Republic of Macedonia revealed by screening of cattle sera using a novel enzyme-linked immunosorbent assay*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(3): p. e0003519.
142. Nouvellet, P., et al., *The role of rapid diagnostics in managing Ebola epidemics*. Nature, 2015. **528**(7580): p. 109-116.
143. Lee, S., S. Mehta, and D. Erickson, *Two-Color Lateral Flow Assay for Multiplex Detection of Causative Agents Behind Acute Febrile Illnesses*. Anal Chem, 2016. **88**(17): p. 8359-8363.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

---

Ort, Datum, Unterschrift

**Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen:**

- Vortrag (6<sup>th</sup> European Congress of Virology, Hamburg): Anne Rackow, Mathias Hartmann, Anna-Maria Werner, Angela Mika, Petra Emmerich, Herbert Schmitz, Christina Deschermeier, **“The immunoglobulin-like domain of HsFcμR (TOSO, FAIM3) binds IgM/antigen immune complexes and can be used as a novel capture molecule in serological tests”**
- Vortrag (27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Marburg): Anne Rackow, Christa Ehmen, Anna-Maria Mallmann, Jürgen Sievertsen, Herbert Schmitz, Jonas Schmidt-Chanasit, Christina Deschermeier, Angela Mika, **„Development of a novel highly specific ZIKV immune complex binding IgG ELISA.“**
- Patent: **“Nachweis von IgM-Antikörpern mit einem verbesserten Immunkomplex-(IC) ELISA“**, Patentnummer: 14188831.1.3-1408/3009841
- Publikation (in Bearbeitung): Anne Rackow, Christa Ehmen, Anna-Maria Mallmann, Petra Emmerich, Salih Ahmeti, Ana Maria Bispo de Filippis, Jonas Schmidt-Chanasit, Herbert Schmitz, Angela Mika, Christina Deschermeier, **“The immunoglobulin-like domain of HsFcμR binds IgM/antigen immune complexes and can be used as a new capture molecule in serological tests detecting Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus - and Zika Virus - specific IgM antibodies”**

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Schmitz für die bereitwillige Übernahme der Betreuung und der Begutachtung dieser Promotionsarbeit bedanken. Durch die Entwicklung des IgG-IC-ELISA ermöglichten Sie mir erst die Masterarbeit und anschließend diese Promotionsarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Burmester für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Des Weiteren geht ein ganz herzlicher Dank an die Arbeitsgruppe DDL des Bernhard-Nocht Instituts, die es mir ermöglicht hat, diese Promotionsarbeit anzufertigen.

Dr. Angela Mika, die stets ein offenes Ohr bei auftretenden Problemen hatte, Jasmin Oehlmann und Christina Herrde, die mir eine große Hilfe beim Erlernen der Methodik und der praktischen Umsetzung waren, Christa Ehmen, die durch ihren Besuch in Brasilien den ZIKV-Test vorangebracht hat und Anna Mallmann, die mir vor allem in dem letzten Jahr bei allen Fragen stets zur Seite stand. Dank euch war der Laboralltag spannend und das Arbeiten mit viel Freude verbunden.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Christina Deschermeier für die hervorragende Betreuung, sei es beim Schreiben oder der Versuchsplanung und für die produktiven Gespräche. Ich bin dir sehr dankbar, dass du immer Zeit für meine Anliegen hattest und mir die Freiheiten gegeben hast, eigene Lösungswege zu finden. Vielen Dank!

Ute und Jessi danke ich für die vielen Ideen und Anregungen rund ums Schreiben.

Ich danke Marcel, der immer für mich da ist, egal wie es gerade läuft und der hoffentlich für immer diesen wichtigen Platz in meinem Leben einnimmt.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, kann ich gar nicht genug danken. Ihr habt mir diesen Berufsweg durch eure Unterstützung erst ermöglicht. Danke!