

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg  
Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. med. Egbert Tannich

## Diagnostik hämorrhagischer Fiebertypen

Habilitationsschrift  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)  
der Universität Rostock

Vorgelegt von:  
Dr. rer. nat. Petra Emmerich-Paloh  
geboren am 17.09.1958 in Hildesheim

**Gutachter:**

Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger  
UMR, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Abt. Tropenmedizin, Infektionskrankheiten  
und Sektion Nephrologie

Prof. Dr. Robert Krause  
Medizinische Universität Graz, Sektion Infektiologie und Tropenmedizin

Prof. Dr. Benjamin Mordmüller  
Universitätsmedizin Greifswald, Institut für Pathologie

**Datum der Einreichung:** 15. August 2018

**Datum der Verteidigung:** 25. März 2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Originalarbeiten</b>	<b>3</b>
3.1	Strain-specific antibody response to Lassa virus in the local population of west Africa. Emmerich <i>et al.</i> (2008)	3
3.1.1	Fragestellung	3
3.1.2	Material und Methoden	3
3.1.3	Ergebnisse	3
3.1.4	Schlussfolgerungen	3
3.2	Early serodiagnosis of acute human Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections by novel capture assays. Emmerich <i>et al.</i> (2010)	4
3.2.1	Fragestellung	4
3.2.2	Material und Methoden	4
3.2.3	Ergebnisse	4
3.2.4	Schlussfolgerungen	4
3.3	Specific detection of antibodies to - different flaviviruses using a new immune complex ELISA. Schmitz <i>et al.</i> (2011)	5
3.3.1	Fragestellung	5
3.3.2	Material und Methoden	5
3.3.3	Ergebnisse	5
3.3.4	Schlussfolgerungen	5
3.4	Detection of Serotype-Specific Antibodies to the Four Dengue Viruses Using an Immune Complex Binding (ICB) ELISA. Emmerich <i>et al.</i> (2013)	6
3.4.1	Fragestellung	6
3.4.2	Material und Methoden	6
3.4.3	Ergebnisse	6
3.4.4	Schlussfolgerungen	6
3.5	Sensitive and specific detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) - specific IgM and IgG antibodies in human sera using recombinant CCHFV nucleoprotein as antigen in $\mu$ -capture and IgG immune complex (IC) ELISA tests. Emmerich <i>et al.</i> (2018)	7
3.5.1	Fragestellung	7
3.5.2	Material und Methoden	7
3.5.3	Ergebnisse	7
3.5.4	Schlussfolgerungen	7

3.6	Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo. Emmerich <i>et al.</i> (2018)	8
3.6.1	Fragestellung	8
3.6.2	Material und Methoden	8
3.6.3	Ergebnisse	8
3.6.4	Schlussfolgerungen	8
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>9</b>
<b>5</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>13</b>
6.1	Der Habilitation zugrunde liegende Arbeiten	13
6.2	Weitere Referenzen	14
<b>7</b>	<b>Originalarbeiten</b>	<b>18</b>

**Selbstständigkeitserklärung**

**Danksagung**

## 1 Einleitung

Die wichtigsten Vertreter der Hämorrhagischen Fieberviren (HFV) gehören zu den Familien der Arena-, Bunya-, Filo-, und Flaviviren. Als Vektoren dienen meist Arthropoden (Zecken und Mücken), daher werden diese Viren oft als „Arbo-Viren“ (d.h. „arthropod-borne“) bezeichnet. Für das Krim-Kongo Hämorrhagische Fieber sind Zecken gleichzeitig Vektor und Reservoir. In vielen Fällen ist der Mensch der Endwirt der Infektionskette. Bei Dengue- und Gelbfieber hingegen, kann der Mensch im Vektor-Wirt-Vektor-Zyklus auch als Zwischenwirt fungieren.

Einige HFV können direkt von Mensch zu Mensch übertragen werden (Lassa-, Ebola-, Marburg- und Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus) und Epidemien auslösen. Es besteht durch diese HFV die Möglichkeit, dass Epidemien außerhalb der Endemiegebiete hervorgerufen werden können. Daher sind von Mensch-zu-Mensch übertragbare HFV in die höchste Risikogruppe 4 eingestuft.

HFV sind fast ausschließlich akut verlaufende Erkrankungen, die in der Regel in den Tropen und Subtropen vorkommen. Klinisch sind sie häufig durch schwer verlaufende Blutungen charakterisiert, sie können jedoch auch inapparent-subklinisch oder milde verlaufen.

### Diagnostik HFV

Die Diagnose ist oft schwierig, da die Symptome meist wie bei anderen fieberhaften Infektionen mit respiratorischer oder gastrointestinaler Symptomatik verlaufen. Typische Zeichen wie Blutungen treten meist erst im späteren Verlauf auf. Bei unklarem Fieber, Aufenthalt im Endemiegebiet innerhalb der letzten drei Wochen und Vorliegen typischer VHF-Symptome wie Blutungen oder Organversagen sollte sofort eine Labordiagnostik auf HFV eingeleitet werden. Die klinischen Bilder der unterschiedlichen HFV ähneln einander; die Verbreitungsgebiete der Viren unterscheiden sich jedoch in vielen Fällen.

Eine Diagnostik muss so schnell wie möglich erfolgen, da eine Ribavirin-Therapie bei Arena- und Bunya-Virus-Infektionen nur in der Frühphase erfolgversprechend ist. Auch nehmen mit der Zeit die Zahl von Kontaktpersonen sowie das Risiko einer Übertragung aufgrund ansteigender Viruslast im Indexpatienten zu. In der Vergangenheit wurde bei importierten VHF häufig zu lange abgewartet, bis eine Diagnostik eingeleitet wurde.

Die Methode der Wahl zum Nachweis bzw. Ausschluss von akuten VHF ist die RT-PCR. Diese erfolgt vorwiegend aus Serum und Liquor und dauert nach Eintreffen der Probe im BNITM nur wenige Stunden. Zusätzlich erfolgt der IgG- und IgM-Nachweis durch geeignete serologische Testverfahren. Als Goldstandard gilt nach wie vor der Nachweis durch den indirekten Immunfluoreszenz-Test (IIFT). Bei Überlebenden können IgM und IgG je nach HFV 4-14 (36) Tage nach Infektion nachgewiesen werden.

Wir arbeiten seit vielen Jahren an der kontinuierlichen Verbesserung von serologischen Nachweisverfahren der HFV. Der Nachweis mittels RT-PCR ist zwar nach wie vor das entscheidende diagnostische Verfahren, aber serologische Nachweisverfahren mit einer hohen Sensitivität und Spezifität können die Diagnose absichern, da bei den hochsensitiven RT-PCR-Verfahren Kontaminationen zu falschen Ergebnissen führen können. Auch für Seroprävalenzstudien ist eine entsprechende Antikörperdiagnostik unerlässlich. Heute lassen sich zwar schon viele bekannte Virusproteine molekulargenetisch herstellen, allerdings setzt dies eine vorherige Virusisolierung, d.h. eine Replikation der Viren in Zellen voraus, die nur in einem BSL4-Labor durchgeführt werden darf, wie es am BNITM gegeben ist. In BSL4-Laboratorien können infizierte Zellen als virale Antigenquelle verwendet werden, sodass Antikörper gegen alle viralen Antigene im IIFT nachgewiesen werden. Des Weiteren müssen zur Entwicklung von serologischen Testen Virus-Referenzstämme vorliegen, sowie zahlreiche positive Seren und Verlaufskontrollseren. Dies setzt langwierige Vorarbeiten in den entsprechenden Endemiegebieten voraus.

Der Nachweis muss einerseits schnell und zuverlässig erfolgen und andererseits möglichst mit einfachen Nachweismethoden unter Feldbedingungen durchführbar sein. Außerdem müssen wir auch molekulargenetisch auf dem neuesten Stand sein, um neue bisher unbekannte Viren detektieren zu können. Hier ist das „Next-Generation Sequencing“ (NGS) Verfahren unerlässlich, das in unserem Institut etabliert wurde.

Aus Veröffentlichungen (siehe Anlage „Literaturverzeichnis“) wurden einige Arbeiten ausgewählt und zur vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift zusammengestellt.

## **2 Fragestellung**

1. Entwicklung und Validierung hochsensitiver und spezifischer serologischer Nachweisverfahren zur Diagnostik akuter und durchgemachter Infektionen mit HFV, insbesondere DENV, CCHFV, LASV.
2. Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunantwort unter Verwendung der neu entwickelten Tests anhand von akuten Serumproben, Follow-up Seren und Seroprävalenzstudien.
3. Anwendung moderner molekulargenetischer Verfahren (NGS) zur Identifikation neuer humanpathogener Viren sowie phylogenetische Analysen von Patientenisolaten, um Aussagen über die zirkulierenden Virusstämme mit eventuell unterschiedlicher Pathogenität und/oder Antigenität zu erhalten.

### 3 Originalarbeiten

#### 3.1 Strain-specific antibody response to Lassa virus in the local population of west Africa.

Emmerich *et al.* (2008), J. Clin. Virol. 42(1): 40-4.

##### 3.1.1 Fragestellung

Durch die Isolierung eines neuen Lassa-Virus (LASV)-Stammes (AV) aus dem Serum einer an Lassa-Fieber verstorbenen Patientin nach Aufenthalt in der Elfenbeinküste stellte sich die Frage, ob es zu einer stammesspezifischen Antikörperantwort kommt und somit Antikörper gegen den neuen isolierten LASV-Stamm durch bisherige serologische Tests, in denen vorwiegend der LASV-Stamm Josiah eingesetzt wird, nicht zu verlässlich nachgewiesen werden können.

##### 3.1.2 Material und Methoden

960 Serumproben erwachsener Probanden aus verschiedenen Regionen Westafrikas wurden auf Reaktivität gegen Antigene von drei Virusstämmen getestet: Josiah-Stamm / Sierra Leone, AV-Stamm / Elfenbeinküste und CSF-Stamm / Nigeria. Die Antikörperantwort auf LASV wurde sowohl durch einen indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) als auch durch einen hochempfindlichen reversen ELISA untersucht. Serumproben von bestätigten Lassa-Fieber-Fällen dienten als positive Kontrollen. Alle Seren wurden zusätzlich durch IIFT auf lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) (Stamm Armstrong) und Mopeia-Virus getestet.

Um die Ähnlichkeit der Antikörperreaktionsmuster zu den verschiedenen Antigenen sichtbar zu machen, wurden die Seren in fünf Reaktivitätscluster gruppiert.

##### 3.1.3 Ergebnisse

Signifikante Titerunterschiede und Clusteranalysen zeigten stammsspezifische Antikörper in 64 der 88 positiven Proben. Je nach geographischer Herkunft der Proben wären bis zu 32% der Anti-LASV-Antikörper-positiven Proben nicht nachgewiesen worden, wenn lediglich die IIFT mit dem LASV-Prototyp-Stamm Josiah durchgeführt worden wäre. Bei 20 Patienten mit akutem Lassa-Fieber wurden keine Unterschiede im Antikörpertiter zwischen den LASV-Antigenen beobachtet.

##### 3.1.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass LASV-NP-spezifische Antikörper, ähnlich wie LASV-spezifische neutralisierende Antikörper, bevorzugt mit Antigenen von lokalen Virusstämmen reagieren. Unsere Daten legen nahe, dass Antigene die aus regionalen LASV-Stämmen hergestellt wurden, angewendet werden sollten, wenn Seroprävalenzstudien in verschiedenen Teilen Westafrikas durchgeführt werden.

## **3.2 Early serodiagnosis of acute human Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections by novel capture assays.**

Emmerich *et al.* (2010), J. Clin. Virol. 48(4): 294-5.

### 3.2.1 Fragestellung

Zum Nachweis von Antikörpern gegen CCHFV bestand aufgrund zunehmender CCHFV-Infektionen in südosteuropäischen Balkanstaaten die Notwendigkeit der Entwicklung einer frühen, sensitiven und schnellen Serodiagnostik akuter CCHFV-Fälle unabhängig von RT-PCR-Kapazitäten. Daher stellte sich die Frage, ob es möglich wäre, eine solche Diagnostik zu realisieren.

### 3.2.2 Material und Methoden

Wir produzierten monoklonale Antikörper gegen das CCHFV-Nukleokapsid durch Immunisierung von Balb/c Mäusen mit dem infektiösen CCHFV-Stamm ArD39554. Für den Nachweis von Anti-CCHFV IgG-Antikörpern nutzen wir die Technik des RF-Testes. Hier werden Patientenserum und das mit einem Detergenz (NP40) inaktivierte CCHFV-Gewebekulturantigen gemeinsam auf der mit Rheumatoid Factor (RF) beschichteten Mikrotiterplatte gebunden. Die Bindung des Immunkomplexes wird vom RF erkannt und anschließend mit dem in der Maus produzierten, aufgereinigten und biotinylierten, monoklonalen Antikörper A4 gegen das CCHFV-Nukleokapsid nachgewiesen. Zum Nachweis von CCHFV-IgM-Antikörpern wurden Mikrotiterplatten mit käuflichem anti-human IgM (Fa. Sigma) beschichtet. Die beiden neuen ELISAs wurden mit einem Serumpanel von 124 Proben, entnommen von Patienten während der Akut- und Rekonvaleszenz-Phase der Infektion, validiert. Zusätzlich wurden alle Serumproben mit dem im WHO-Referenzlabor für CCHF in Slowenien verwendeten standardisierten ELISA untersucht.

Zur Bestimmung der Spezifität wurden 234 negative Seren und 150 Seren deutscher Blutspender getestet.

### 3.2.3 Ergebnisse

Der IgG ELISA zeigte eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 97,7%. Der IgM ELISA zeigte eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 98,3%. Im Letzteren zeigten 12 PCR-positive Seren, die im WHO-Referenztest negativ für CCHFV-IgM getestet wurden, positive Ergebnisse für den Nachweis von IgM-Antikörper.

### 3.2.4 Schlussfolgerungen

Diese zwei neu entwickelten Capture-Assays zur frühen Serodiagnostik akuter humaner Krim-Kongo Hämorrhagischer Fiebervirus-Infektionen konnten somit zur Detektion von akuten CCHFV-Infektionen in den NIPH-Laboratorien im Kosovo und im Iran eingesetzt werden.

### **3.3 Specific detection of antibodies to - different flaviviruses using a new immune complex ELISA.**

Schmitz *et al.* (2011), *Med Microbiol Immunol.* 200(4): 233-9.

#### 3.3.1 Fragestellung

Die Tatsache, dass der RF aus der IgM-Fraktion von Seren verschiedener Patienten mit rheumatoider Arthritis gewonnen wurde und hiervon aber nur 10% RF spezifisch sind, machte eine Reproduzierbarkeit und somit Standardisierung der unter 3.2 und Emmerich *et al.* 2006 beschriebenen Testentwicklungen zum Nachweis von IgG-Antikörpern durch IC-Bindung an Rheumafaktor sehr schwierig. Deshalb stellten wir uns die Frage, ob es ein anderes Protein gibt, das humane und ggf. auch tierische IgG-Antikörper-Antigenkomplexe *in vitro* binden kann.

#### 3.3.2 Material und Methoden

Maxisorb-Mikrotiter-Streifen wurden mit diversen Fc-Rezeptor-Proteinen (FcR) beschichtet. Als Antigen verwendeten wir die in unserer Abteilung rekombinant hergestellten Domänen III für verschiedene Flaviviren, die eine spezifische serologische Aussage einer virusspezifischen Flavivirus-Infektion im Hinblick auf IgG-Antikörper möglich macht.

Es wurden humane Serumproben mit oder ohne Antikörper gegen WN- und FSME-Viren ausgewählt. Darüber hinaus wurde ein humaner monoklonaler WNV-Antikörper (MAk), der gegen die ED3-Domäne des WN-Virus (Klon 4,384) gerichtet ist, mit in die Studie eingeschlossen. Abschließend wurden Seren und MAks diverser immunisierter Tiere mit oder ohne Antikörper gegen WN- oder FSME-Viren ausgewählt, um die Interspezies-Reaktivität der IC-bindenden Moleküle an der festen Phase zu testen.

#### 3.3.3 Ergebnisse

Das beste Resultat wurde mit gekauftem lyophilisierten CD32 (Fa. Sinobiological) zur Detektion von Immunkomplexen (IC) erzielt.

Mit der Verwendung rekombinanter WNV- und FSMEV-Domäne III Antigene konnte ein virusspezifischer IgG-Antikörpernachweis entwickelt werden, der bisher, aufgrund der ausgeprägten Kreuzreaktionen verschiedener Flaviviren durch Verwendung von Gewebekulturantigenen, nicht möglich war.

#### 3.3.4 Schlussfolgerungen

Das Molekül CD32 hat ähnliche oder sogar bessere Bindungskapazitäten als RF. Ein weiterer Vorteil beruhte auf der Beobachtung, dass im Vergleich zu RF auch tierische IgG-Antikörper detektiert werden können.

Die neu entwickelten Immun-Complex-Tests mit ED3 spezifischen rekombinanten Flavivirus-Antigenen sollten bei zukünftigen Seroprävalenzstudien eingesetzt werden.

### **3.4 Detection of Serotype-Specific Antibodies to the Four Dengue Viruses Using an Immune Complex Binding (ICB) ELISA.**

Emmerich *et al.* (2013), PLoS Negl Trop Dis. 26: 7(12).

#### 3.4.1 Fragestellung

Zeigt ein ICB-Elisa mit vier POD-markierten EDIII-Proteinen (DeP1-4) als Antigen eine ausreichende Sensitivität und Spezifität, um DENV-Serotyp-spezifische Antikörper bei rekonvaleszenten Patienten mit einer Primärinfektion, sowie bei Patienten mit akuter Dengue-Virus-Infektion, sicher nachzuweisen?

#### 3.4.2 Material und Methoden

Zum Nachweis der vier DENV-Serotypen in frühen Serumproben von infizierten Patienten wurde eine DENV RT-PCR durchgeführt. Ein DENV-Mikroneutralisationstest erfolgte mit DENV infizierten Vero-E6 Zellen. Die vier rekombinanten DENV-EDIII-Proteine, sowie der extrazelluläre Teil von CD32 (FcγRIIa H131) wurden exprimiert, gereinigt und die hergestellten rekombinanten DENV-EDIII-Antigene wurden mit POD markiert. Zur Verstärkung der Serotyp-spezifischen Reaktionen wurde ein Überschuss an heterologen, unmarkierten DENV-EDIII-Antigenen (De1-4) zu dem markierten DeP1-4 hinzugefügt. Die ICB-ELISAs wurden - wie zuvor unter 3.3 beschrieben - für den Nachweis von Antikörpern gegen die EDIII-Antigene von WNV und FSMEV durchgeführt. Getestet wurden 64 Patientenserum mit primärem Dengue-Fieber, 87 Serumproben gesunder vietnamesischer Personen und 88 Seren aus unserer Routinediagnostik, die im IIFT keine Antikörper gegen DENV hatten.

#### 3.4.3 Ergebnisse

Nach einer primären DENV-Infektion waren typspezifische Antikörper in fast allen Proben, die mindestens zwei Wochen nach Beginn der Erkrankung gesammelt wurden, nachweisbar. Die Sensitivität betrug 86% ab dem 3. Krankheitstag und 100% ab dem 20. Krankheitstag. Die typspezifischen Antikörper wurden vor der zweiten Krankheitswoche nicht beobachtet. Die Spezifität des DENV-ICB-ELISA betrug 100% mit den DeP1-4-Antigenen in Gegenwart eines 100-fachen Überschusses des iTBEP EDIII-Antigens.

#### 3.4.4 Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass mit dem ICB-ELISA bei gesunden, erwachsenen Probanden in einer endemischen Region sowohl primäre als auch sekundäre Infektionen identifiziert werden können und sie werden von Nutzen sein, um die Verteilung der verschiedenen typspezifischen Anti-DENV-Antikörper in DENV-Endemiegebieten zu bestimmen.

### **3.5 Sensitive and specific detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) - specific IgM and IgG antibodies in human sera using recombinant CCHFV nucleoprotein as antigen in $\mu$ -capture and IgG immune complex (IC) ELISA tests.**

Emmerich *et al.* (2018), PLoS Negl Trop Dis. 26:12(3).

#### 3.5.1 Fragestellung

Die unter 3.2 beschriebenen Nachweisverfahren zur Detektion von Antikörpern gegen CCHFV sollen zu unter S1-Bedingungen herstellbaren Testkits weiterentwickelt werden, indem aufwändig herzustellende Testkomponenten (humaner Rheumafaktor, inaktiviertes Zellkulturantigen, monoklonaler Antikörper) durch rekombinant in *E.coli* herstellbare Komponenten (rekombinantes CCHFV Antigen, IgG IC Capture Molekül CD32 - siehe Publikation Schmitz *et al.*, 2011) ersetzt werden.

#### Material und Methoden

CCHFV-NP wurde rekombinant in *E.coli* exprimiert, aus der löslichen Fraktion des Bakterienlysats chromatographisch aufgereinigt und mit Peroxidase (Sigma) markiert. Die Validierung der Tests erfolgte unter Verwendung longitudinaler Serumproben von 15 RT-PCR bestätigten CCHF-Patienten aus dem Kosovo und 120 a priori CCHFV-IgM/IgG-negativer Seren. Die entwickelten Tests wurden mit kommerziell erhältlichen Testkits der Firma Vector-Best sowie der CCHFV-IIFT als Goldstandard verglichen.

#### 3.5.2 Ergebnisse

Der neu entwickelte CCHFV-IgM-Test detektierte, ebenso wie der CCHFV-IIFT und der kommerzielle CCHFV-IgM-ELISA, IgM-Antikörper in allen Patientenproben, die nach Tag 5 nach Einsetzen der Symptome abgenommen worden waren. Der neu entwickelte CCHFV-IgG-Test detektierte ebenso wie der CCHFV-IIFT, IgG-Antikörper in allen Patientenproben, die nach Tag 11 nach Einsetzen der Symptome abgenommen worden waren und zeigte somit eine höhere Sensitivität als der kommerzielle CCHFV-IgG-ELISA. Alle untersuchten ELISAs zeigten eine hervorragende Spezifität von 100%.

#### 3.5.3 Schlussfolgerungen

Die neu entwickelten ELISAs (CCHFV-IgM-ELISA für die Akutdiagnostik, CCHFV-IgG-ELISA für spätere Krankheitsstadien und Seroprävalenz-Studien) sind vergleichbar mit den IIFT-Goldstandardtesten, wenn sie entsprechend ihrem beabsichtigten diagnostischen Zweck angewendet werden. Die Sensitivität des neu entwickelten CCHFV-IgG-ELISAs übertrifft die des kommerziellen Tests.

### **3.6 Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo.**

Emmerich *et al.* (2018), *Infect Genet Evol.* 65:6-11.

#### 3.6.1 Fragestellung

Obwohl das Auftreten von CCHFV bei Zecken und Menschen im Kosovo berichtet wurde, gab es nur sehr begrenzte Kenntnisse über die genetischen Eigenschaften und die Entwicklung von CCHF beim Menschen. Das Ziel dieser Studie war es, die mögliche Herkunft, evolutionäre Merkmale, die Phylogeographie des CCHFV im Kosovo und zusätzlich das Virom im Serum von Patienten mit CCHF aufzuklären.

#### 3.6.2 Material und Methoden

Im Rahmen dieser Studie wurden 12 Akut-Phase-Serumproben von CCHF-Patienten aus dem Kosovo im Zeitraum 2013 - 2015 einer metagenomischen Tiefensequenzierung (Next-Generation Sequencing - NGS) unterzogen. Um sowohl die phylogenetischen als auch Beziehungen und den Ursprung des CCHFV aus dem Kosovo zu untersuchen, wurde ein Bayesisches Markov-Chain-Monte-Carlo-Verfahren (MCMC) und eine Maximum-Likelihood-Methode (ML) angewendet.

#### 3.6.3 Ergebnisse

Die phylogenetische Analyse zeigte, dass die CCHF-abgeleiteten Stämme in eine getrennte monophyletische Gruppe innerhalb des CCHFV-Genotyp V (Europa 1) eingruppiert werden können. Alle vom Menschen stammenden Stämme gruppieren sich in vier Untergruppen, von denen einer der drei Stämme aus Bulgarien gebildet wurde, während sich die von Zecken abgeleiteten Varianten in eine separate Unterklasse gruppieren. In den Serumproben der CCHF-Patienten fanden wir virale Sequenzen, welche mit mehreren Virusfamilien und einem nicht klassifizierten durch Zecken übertragenen segmentierten RNA-Virus, dem Jingen-Tickvirus (JMTV), übereinstimmen. Das JMTV-Genom umfasst zwei Segmente, die mit den NS2B-NS3- und NS5-Nichtstrukturproteingenen der Gattung *Flavivirus* (Familie *Flaviviridae*) verwandt sind. Wie bei der Viruslast-Bestimmung durch RT-PCR konnte durch die virale Metagenomik in an CCHF verstorbenen Patienten eine höhere CCHFV-RNA-Last nachgewiesen werden als bei Patienten, die CCHF überlebten.

#### 3.6.4 Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse deuten auf eine einzige Einführung von CCHFV aus der Türkei in den Kosovo hin. Die Anpassung des Virus an die Wirtspopulationen und seine enzootische Aufrechterhaltung führten zu den lokalen Virusvarianten.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunkomplexbindungs-ELISA-Tests (ICB-ELISAs) zum Nachweis von Antikörpern gegen VHF entwickelt und durch Verwendung von neuen rekombinanten Antigenen weiter verbessert.

Ein großer Vorteil der ICB-ELISA-Tests ist die einfache Durchführung. Es bedarf nur eines Waschschriffs und der Ablesung der Extinktion mittels eines Photometers. Gleichzeitig bewirkt die Auswahl passender Testantigene eine hohe Sensitivität und Spezifität. Da der Rheumafaktor, der als Fängermolekül [1, 2] anfangs als ICB-Grundlage verwendet wurde, nicht standardisiert hergestellt werden konnte, wurde er durch das Protein CD32, das bevorzugt Antigen-Antikörper-Komplexe von hoher Avidität bindet [3] ersetzt. Ein weiterer Vorteil des CD32 besteht in der Erkennung von Antigen-Antikörper-Komplexen auch bei tierischen IgG-Antikörpern. CD32 wird mittlerweile gentechnisch im BNITM hergestellt [4-7]. ICB-ELISA-Teste zum Nachweis von Lassa- [8] und CCHF-Virusantikörpern [7] wurden mit rekombinanten hergestellten Antigenen gegen das Nukleokapsid-Protein (NP) entwickelt [9-16]. Die meisten ELISAs zum IgG-Nachweis sind indirekte ELISAs [12-14, 16-19], während IgM-ELISA-Anwendungen auf  $\mu$ -Capture beruhen [2, 17, 20, 21]. Die Verwendung von rekombinanten Antigenen hat den Vorteil, dass Serumproben unter S1-Bedingungen getestet werden können und nicht, wie die Herstellung von Zellkulturantigenen, ein BSL4-Labor erfordern. Durch die Direktmarkierung des NP-Antigens mit Peroxidase konnten wir zusätzlich den Schritt der Detektion des IC-Komplexes mit monoklonalen Antikörpern einsparen [2, 20, 21]. Das NP induziert eine frühe, starke und lang anhaltende Immunantwort beim Menschen. Allerdings zeigten unsere entwickelten Tests zum Nachweis von LASV, DENV und CCHFV eine verzögerte IgG-Antwort im Vergleich zum IIFT. Daraus ist zu schließen, dass erste IgG-Antikörper, die während einer akuten Infektion gebildet werden, nicht ausschließlich gegen das Nukleoprotein, sondern auch gegen andere Antigene, wie das Virus-Hüllglykoprotein Gc gebildet, werden. Diese Beobachtung wurde auch von Putkuri et al. [22] für das Inkoo-Virus (INKV) beschrieben.

Die Herstellung der EDIII-Domänen [4, 23] unter Verwendung verschiedener EDIII-Konstrukte [24, 25] der Dengue-Virus-Subtypen 1, 2, 3 und 4 zur Erkennung von Flavivirus-kreuzreagierenden Epitopen [26-28] zeigten in der unter 3.4 beschriebenen Publikation, dass Serotyp-spezifische IgG-Antikörper, die mit DeP-Antigenen und gleichzeitig mit CD32 reagieren, nur in ca. 1% der Fälle und erst zwei Wochen nach Beginn des Fiebers auftreten, dafür jedoch mehrere Jahre bestehen, ähnlich wie neutralisierende DENV-Antikörper [27, 29]. Midgley et al. [30] zeigen mittels kompetitiven ELISAs, dass während der primären DENV-Infektion die maximale Aktivität gegen das homologe EDIII-Antigen des infizierenden Serotyps gerichtet ist. Unsere Daten zu Primärinfektionen stimmen damit überein.

Berichte über das Vorhandensein aller vier DENV-Serotypen in Vietnam [31-34] stützen unsere Ergebnisse wie unter 3.4 beschrieben, aber der geringe Anteil von nur 21% Sekundärin-

fektionen steht im Gegensatz zu früheren Daten, die mit PRNT über das Vorhandensein von Sekundärinfektionen in Thailand erhalten wurden [34, 35].

Durch die Kenntnis der Serotyp-spezifischen Antikörperantwort könnte das Risiko von Sekundärinfektionen mit einem neuen Serotyp vorhergesagt werden. Informationen über Serotyp-spezifische Antikörper können weiterhin helfen, die Immunantwort nach ggf. baldiger erfolgreich entwickelter DENV-Impfung zu überwachen.

Genetische Analysen verschiedener isolierter LASV-Stämme aus unterschiedlichen Regionen Westafrikas wiesen einen hohen Grad an Nukleotid- und Aminosäureschwankungen des Glyko- und Nukleoproteins auf [36-41] und deuteten darauf hin, dass sowohl stammspezifische als auch gemeinsame Epitope auf den verschiedenen LASV-NPs vorkommen. Diese These konnte durch die unter 3.1 beschriebenen Untersuchungen bestätigt werden. Unsere Seroprävalenzstudie mit dem Josiah-Stamm aus Sierra Leone [42, 43], dem AV-Stamm von der Elfenbeinküste und dem CSF-Stamm aus Nigeria [41], zeigte, dass 32% der positiven Seren nur durch die Verwendung des LASV-AV-Stammes [44] detektiert wurde. Diese Kenntnis war besonders relevant für die Seren aus Ghana, Benin und der Elfenbeinküste, wo bisher mit einer Ausnahme [44] keine klinischen Fällen von Lassa-Fieber berichtet wurden. Bei akutem Lassa-Fieber war noch keine stammspezifische Antikörperantwort ersichtlich. Dies scheint eine Affinitätsreifung der Antikörper oder eine verbesserte Erkennung von stammspezifischen Epitopen während der ersten Wochen nach der Primärinfektion zu erfordern [45, 46].

Unsere unter 3.6 beschriebenen Ergebnisse deuten auf eine einzige Einführung von CCHFV in den Kosovo hin, wobei die Türkei als möglicher Ursprung für die Vorfahren der südeuropäischen CCHF-Ausbrüche angesehen werden kann. Die Anpassung des Virus an die Wirtspopulationen und seine enzootische Aufrechterhaltung führten zu lokalen Virusvarianten. Die am häufigsten beobachteten Viren, die bei Ko-Infektionen mit CCHFV nachgewiesen werden konnten, waren Anelloviren und GC-Viren, die als Biomarker des Immunstatus angesehen werden [47, 48]. Frühere Studien zeigten, dass von *Rhipicephalus* und *Haemaphysalis* spp. auf verschiedene Karnivoren, Affen und Rindern übertragene Jingmen-Tick-Viren (JMTV) einen häufigen Wirtswechsel und genomische Reassortierung aufweisen [49, 50]. Bis heute wurde keine humane Infektion mit JMTV beschrieben. Daher rechtfertigt die Entdeckung von JMTV-Ko-Infektionen bei humanen CCHF-Fällen weitere Untersuchungen, z.B. um einen möglichen Einfluss von JMTV auf Übertragungswege, Wirtsspektrum und Pathogenität auf CCHF zu erkennen.

#### **Zusammenfassend:**

Die Entwicklung neuer serologischer Tests zum Nachweis von VHF-Viren mit verbesserter Sensitivität und Spezifität erleichtert nicht nur die Untersuchung epidemiologischer Fragestellungen, sondern hilft vor allem dabei, die komplexen Vorgänge der Antikörperbildung nach Infektion mit VHF-Viren besser zu erforschen.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

agIgG	aggregiertes IgG
BHK-21	Baby Hamster Nieren Zelllinie
BSL4	Biologische Schutzstufe 4
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
CCHF	Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber
CCHFV	Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber Virus
CI	Konfidenzintervall
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
AV	Lassa Virusstamm AV
DENV	Dengue Virus
DENV-NS1	Dengue Virus Nichtstrukturprotein 1
DeP	Dengue Virus Peroxidasekonjugat
DeP1	Dengue Virus 1 Peroxidasekonjugat
DeP3	Dengue Virus 3 Peroxidasekonjugat
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
E. coli	Escherichia Coli
EDIII	Domäne III des Denguevirus E-Proteins
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HFV	Hämorrhagische Fiebertviren
HRP	Merretich Peroxidase
IC	Immun Komplex
ICB	Immun Komplex Bindung
IFA	Indirekter Immunfluoreszenz Assay
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IIFT	indirekter Immunfluoreszenz Test
IL6	Interleukin-6
INKV	Inkoo Virus
iTBEP	inaktiviertes TBE Antigen - Peroxidase markiert
JMTV	Jingmen tick virus
kDa	Kilodalton
LASV	Lassa Virus
LAV-NP	Lassa Virusstamm AV- Nukleokapsid Protein
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus

LLC-MK2	Affennieren Zelllinie
Log2	Logarithmus zur Basis 2
MAK	Monoklonale Antikörper
MCMC	Monte Carlo Markov Chain
ML	Maximum-Likelihood-Methode
NGS	Next Generation Sequencing
NIPH	National Institute of Public Health
NP	Nukleokapsid-Protein
NPHRP	Nukleokapsid-Protein - HRP markiert
NS1	Nichtstrukturprotein 1
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
POD	Peroxidase
PRNT	Plaque Reduktions Neutralisations Test
QM	Qualitätsmanagement
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleinsäureprotein
ROC	Receiver-Operating-Characteristic
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
S1 - 4	Schutzstufe 1 - 4
TBE	Tick Borne Encephalitis
TNF-a	Tumornekrosefaktor-alpha
UCDCM	Ukrainian Center for Disease Control and Monitoring
Vero E6	Äthiopische Grünmeerkatzennieren Zelllinie
VHF	Virale Hämorrhagische Fieber
WHO	World Health Organisation
WN	West Nil Virus

## 6 Literaturverzeichnis

### 6.1 Der Habilitation zugrunde liegende Arbeiten

#### Publikation 1

Emmerich P., Günther S., Schmitz H.

Strain-specific antibody response to Lassa virus in the local population of west Africa. Journal of Clinical Virology 2008 May; 42(1):40-4.

#### Publikation 2

Emmerich P., Avsic-Zupanc T., Chinikar S., Saksida A., Thomé-Bolduan C., Parczany-Hartmann A., Langroudi A.G., Moradi M., Ahmeti S., Günther S, Schmidt-Chanasit J  
Early serodiagnosis of acute human Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections by novel capture assays. Journal of Clinical Virology 2010 Aug; 48(4):294-5.

#### Publikation 3

Schmitz H., Gabriel M., Emmerich P. - Specific detection of antibodies to - different flaviviruses using a new immune complex ELISA. Medical Microbiology And Immunology 2011 May; 200(4):233-9.

#### Publikation 4

Petra Emmerich, Angela Mika, Herbert Schmitz - Detection of Serotype-Specific Antibodies to the Four Dengue Viruses Using an Immune Complex Binding (ICB) ELISA. Plos Neglected Tropical Diseases 2013 Dec; 26:7(12).

#### Publikation 5

Petra Emmerich, Salih Ahmeti, Ronald von Possel, Anne Rackow, Yang Liu, Herbert Schmitz, Angela Mika, Christina Deschermeier - Sensitive and specific detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) - specific IgM and IgG antibodies in human sera using recombinant CCHFV nucleoprotein as antigen in  $\mu$ -capture and IgG immune complex (IC) ELISA tests. PLOS Neglected Tropical Diseases 2018 Mar; 26:12(3).

#### Publikation 6

Petra Emmerich, Xhevat Jakupi, Ronald von Possel, Lindita Berisha, Bahrije Halili, Stephan Günther, Daniel Cadar, Salih Ahmeti, Jonas Schmidt-Chanasit - Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo. Infection, Genetics and Evolution 2018 Jul; 65:6-11.

## 6.2 Weitere Referenzen

1. Sachers, M., et al., *Simple detection of antibodies to different viruses using rheumatoid factor and enzyme-labelled antigen (ELA)*. J Virol Methods, 1985. **10**(2): p. 99-110.
2. Emmerich, P., et al., *Reverse ELISA for IgG and IgM antibodies to detect Lassa virus infections in Africa*. J Clin Virol, 2006. **37**(4): p. 277-81.
3. Bruhns, P., et al., *Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses*. Blood, 2009. **113**(16): p. 3716-25.
4. Ludolfs, D., M. Reinholz, and H. Schmitz, *Highly specific detection of antibodies to tick-borne encephalitis (TBE) virus in humans using a domain III antigen and a sensitive immune complex (IC) ELISA*. J Clin Virol, 2009. **45**(2): p. 125-8.
5. 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. 233-9.
6. 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.
7. Emmerich, P., et al., *Sensitive and specific detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV)-Specific IgM and IgG antibodies in human sera using recombinant CCHFV nucleoprotein as antigen in mu-capture and IgG immune complex (IC) ELISA tests*. PLoS neglected tropical diseases, 2018. **12**(3): p. e0006366.
8. Gabriel, M., et al., *Development and evaluation of antibody-capture immunoassays for detection of Lassa virus nucleoprotein-specific immunoglobulin M and G*. PLoS neglected tropical diseases, 2018. **12**(3): p. e0006361.
9. Ergonul, O. and C.A. Whitehouse, *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever - A Global Perspective*. 1 ed. 2007: Springer Netherlands.
10. Burt, F.J., et al., *Human defined antigenic region on the nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus identified using truncated proteins and a bioinformatics approach*. Journal of virological methods, 2013. **193**(2): p. 706-12.
11. Carter, S.D., et al., *Structure, function, and evolution of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein*. Journal of virology, 2012. **86**(20): p. 10914-23.
12. Saijo, M., et al., *Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections*. J Med Virol, 2005. **75**(2): p. 295-9.

13. Dowall, S.D., et al., *Development of an indirect ELISA method for the parallel measurement of IgG and IgM antibodies against Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus using recombinant nucleoprotein as antigen*. Journal of virological methods, 2012. **179**(2): p. 335-41.
14. Marriott, A.C., et al., *Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein*. J Gen Virol, 1994. **75 ( Pt 9)**: p. 2157-61.
15. Liu, D., et al., *Fine epitope mapping of the central immunodominant region of nucleoprotein from Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV)*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e108419.
16. Atkinson, R., et al., *Plant-produced Crimean-Congo haemorrhagic fever virus nucleoprotein for use in indirect ELISA*. J Virol Methods, 2016. **236**: p. 170-177.
17. Garcia, S., et al., *Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran*. J Clin Virol, 2006. **35**(2): p. 154-9.
18. Rangunwala, A., R.R. Samudzi, and F.J. Burt, *Detection of IgG antibody against Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using ELISA with recombinant nucleoprotein antigens from genetically diverse strains*. Epidemiol Infect, 2014. **142**(10): p. 2147-54.
19. Samudzi, R.R., et al., *Bacterial expression of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein and its evaluation as a diagnostic reagent in an indirect ELISA*. J Virol Methods, 2012. **179**(1): p. 70-6.
20. Hufert, F.T., W. Ludke, and H. Schmitz, *Epitope mapping of the Lassa virus nucleoprotein using monoclonal anti-nucleocapsid antibodies*. Arch Virol, 1989. **106**(3-4): p. 201-12.
21. 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. 294-5.
22. Putkuri, N., A. Vaheri, and O. Vapalahti, *Prevalence and protein specificity of human antibodies to Inkoo virus infection*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(12): p. 1555-62.
23. Ludolfs, D., et al., *Serological differentiation of infections with dengue virus serotypes 1 to 4 by using recombinant antigens*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(11): p. 4317-20.
24. Wahala, W.M. and A.M. Silva, *The human antibody response to dengue virus infection*. Viruses, 2011. **3**(12): p. 2374-95.
25. Batra, G., et al., *Evaluation of envelope domain III-based single chimeric tetravalent antigen and monovalent antigen mixtures for the detection of anti-dengue antibodies in human sera*. BMC infectious diseases, 2011. **11**: p. 64.

26. Sukupolvi-Petty, S., et al., *Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes*. J Virol, 2007. **81**(23): p. 12816-26.
27. Brien, J.D., et al., *Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against dengue virus type 3*. Journal of virology, 2010. **84**(20): p. 10630-43.
28. Zidane, N., et al., *Cross-reactivities between human IgMs and the four serotypes of dengue virus as probed with artificial homodimers of domain-III from the envelope proteins*. BMC Infect Dis, 2013. **13**: p. 302.
29. Halstead, S.B., *Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses*. Adv Virus Res, 2003. **60**: p. 421-67.
30. Midgley, C.M., et al., *An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection*. J Virol, 2011. **85**(1): p. 410-21.
31. Thai, K.T., et al., *Dengue dynamics in Binh Thuan province, southern Vietnam: periodicity, synchronicity and climate variability*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(7): p. e747.
32. Coudeville, L. and G.P. Garnett, *Transmission dynamics of the four dengue serotypes in southern Vietnam and the potential impact of vaccination*. PloS one, 2012. **7**(12): p. e51244.
33. Pongsiri, P., A. Themboonlers, and Y. Poovorawan, *Changing pattern of dengue virus serotypes in Thailand between 2004 and 2010*. J Health Popul Nutr, 2012. **30**(3): p. 366-70.
34. Tricou, V., et al., *Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(9): p. e1309.
35. Wilder-Smith, A., et al., *Serological evidence for the co-circulation of multiple dengue virus serotypes in Singapore*. Epidemiol Infect, 2005. **133**(4): p. 667-71.
36. Buckley, S.M., J. Casals, and W.G. Downs, *Isolation and antigenic characterization of Lassa virus*. Nature, 1970. **227**(5254): p. 174.
37. Ruo, S.L., et al., *Antigenic relatedness between arenaviruses defined at the epitope level by monoclonal antibodies*. J Gen Virol, 1991. **72 ( Pt 3)**: p. 549-55.
38. Swanepoel, R., et al., *Identification of lppy as a Lassa-fever-related virus*. Lancet, 1985. **1**(8429): p. 639.
39. Bowen, M.D., et al., *Genetic diversity among Lassa virus strains*. Journal of virology, 2000. **74**(15): p. 6992-7004.
40. Clegg, J.C., *Molecular phylogeny of the arenaviruses*. Current topics in microbiology and immunology, 2002. **262**: p. 1-24.
41. Gunther, S., et al., *Lassa fever encephalopathy: Lassa virus in cerebrospinal fluid but not in serum*. J Infect Dis, 2001. **184**(3): p. 345-9.

42. Auperin, D.D. and J.B. McCormick, *Nucleotide sequence of the Lassa virus (Josiah strain) S genome RNA and amino acid sequence comparison of the N and GPC proteins to other arenaviruses*. *Virology*, 1989. **168**(2): p. 421-5.
43. Wulff, H. and K.M. Johnson, *Immunoglobulin M and G responses measured by immunofluorescence in patients with Lassa or Marburg virus infections*. *Bull World Health Organ*, 1979. **57**(4): p. 631-5.
44. Gunther, S., et al., *Imported lassa fever in Germany: molecular characterization of a new lassa virus strain*. *Emerg Infect Dis*, 2000. **6**(5): p. 466-76.
45. Griffiths, G.M., et al., *Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone*. *Nature*, 1984. **312**(5991): p. 271-5.
46. Schmitz, H., H. Mohr, and M. Majoubi, *Differentiation between primary and recurrent cytomegalovirus infections*. *Arch Virol*, 1986. **90**(1-2): p. 41-51.
47. Blatter, J.A., et al., *Anellovirus loads are associated with outcomes in pediatric lung transplantation*. *Pediatric transplantation*, 2018. **22**(1).
48. De Vlaminck, I., et al., *Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy*. *Cell*, 2013. **155**(5): p. 1178-87.
49. Qin, X.C., et al., *A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(18): p. 6744-9.
50. Villa, E.C., et al., *Complete Coding Genome Sequence for Mogiana Tick Virus, a Jingmenvirus Isolated from Ticks in Brazil*. *Genome Announc*, 2017. **5**(18).

## 7 Originalarbeiten

J Clin Virol. 2008 May;42(1):40-4. doi: 10.1016/j.jcv.2007.11.019. Epub 2007 Dec 31.

## **Strain-specific antibody response to Lassa virus in the local population of west Africa.**

Emmerich P(1), Günther S, Schmitz H.

Author information:

(1)Department of Virology, Bernhard-Nocht-Institute for Tropical Medicine, Bernhard-Nocht-Street 74, D-20359 Hamburg, Germany.

**BACKGROUND:** Lassa virus (LAV) isolates obtained from Sierra Leone, Ivory Coast and Nigeria show a high degree of amino acid difference [Günther S, Weisner B, Roth A, Grewing T, Asper M, Drosten C, et al. Lassa fever encephalopathy: Lassa virus in cerebrospinal fluid but not in serum. *J Infect Dis* 2001;184:345-9]. Therefore, three LAV strains from Sierra Leone, Ivory Coast and Nigeria were used as antigens to study the anti-LAV antibody response in 960 serum samples obtained from different regions of west Africa.

**STUDY DESIGN:** The antibody response to LAV was studied both by a standard indirect immunofluorescence assay (IFA) and by a highly sensitive reverse ELISA [Emmerich P, Thome-Bolduan C, Drosten C, Günther S, Ban E, Sawinsky I, et al. Reverse ELISA for IgG and IgM antibodies to detect Lassa virus infections in Africa. *J Clin Virol* 2006;37:227-81].

**RESULTS:** In 88 of the 960 subjects from west African countries (Guinea, Liberia, Ivory Coast, Ghana, Benin, and Nigeria) anti-Lassa antibodies were detected with both assays. Significant titer differences and clustering analysis revealed strain-specific antibodies in 64 of the 88 positive samples. Depending on the geographic origin of the samples, up to 32% of anti-LAV antibody positive samples would not have been detected, if only the IFA had been run with LAV prototype strain Josiah. In 20 patients with acute Lassa fever differences in antibody titer between the three LAV antigens were not observed.

**CONCLUSIONS:** Our data suggest that antigens prepared of regional LAV strains should be applied when seroprevalence studies are conducted in various parts of west Africa.

DOI: 10.1016/j.jcv.2007.11.019

PMID: 18164653 [Indexed for MEDLINE]

J Clin Virol. 2010 Aug;48(4):294-5. doi: 10.1016/j.jcv.2010.05.002. Epub 2010 Jun 11.

**Early serodiagnosis of acute human Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections by novel capture assays.**

Emmerich P, Avsic-Zupanc T, Chinikar S, Saksida A, Thomé-Bolduan C, Parczany-Hartmann A, Langroudi AG, Moradi M, Ahmeti S, Günther S, Schmidt-Chanasit J.

DOI: 10.1016/j.jcv.2010.05.002

PMID: 20541967 [Indexed for MEDLINE]

Med Microbiol Immunol. 2011 Nov;200(4):233-9. doi: 10.1007/s00430-011-0195-0. Epub 2011 May 1.

**Specific detection of antibodies to different flaviviruses using a new immune complex ELISA.**

Schmitz H(1), Gabriel M, Emmerich P.

Author information:

(1)Department of Virology, Bernhard-Nocht-Institute for Tropical Medicine, Bernhard-Nocht-Str.74, 20359 Hamburg, Germany. Schmitz@bni-hamburg.de

Immune complex (IC) ELISAs for IgG antibodies to various virus antigens have turned out to be both highly specific and sensitive. During incubation of a labelled antigen with the serum samples, ICs are formed, which bind to microtiter plates coated with rheumatoid factor (RF) IgM. Here, we describe an improved coating of the solid-phase support comparing various Fc-receptor molecules. IC ELISAs were applied to detect human IgG antibodies to the highly virus-specific ED3 domain of West Nile- and tick-borne encephalitis virus envelopes. Compared with other Fc-receptor molecules like RF or C1q, FcγRIIA (CD32) turned out to bind the ICs composed of IgG antibodies and peroxidase-labelled ED3 antigens more efficiently. Due to low background reactions, sera could be tested at a dilution of 1:10. Moreover, using CD32 instead of RF coating, anti-flavivirus antibodies could be detected in various animal species.

© Springer-Verlag 2011

DOI: 10.1007/s00430-011-0195-0

PMID: 21533786 [Indexed for MEDLINE]

## **Detection of serotype-specific antibodies to the four dengue viruses using an immune complex binding (ICB) ELISA.**

Emmerich P(1), Mika A(2), Schmitz H(1).

### Author information:

(1)Department of Virology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany.

(2)Diagnostics Development Group, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany.

**BACKGROUND:** Dengue virus (DENV) infections are preferentially diagnosed by detection of specific IgM antibodies, DENV NS1 antigen assays or by amplification of viral RNA in serum samples of the patients. The type-specific immunity to the four worldwide circulating DENV serotypes can be determined by neutralization assays. An alternative to the complicated neutralization assays would be helpful to study the serotype-specific immune response in people in DENV hyperendemic areas but also in subjects upon DENV vaccination.

**METHODS:** In consecutive samples of patients with DENV-1-4 infection type-specific antibodies were detected using an immune complex binding (ICB) ELISA. During incubation of serum samples and enzyme-labeled recombinant envelope domain III (EDIII) antigens immune complexes (ICs) are formed, which are simultaneously bound to a solid phase coated with an Fc-receptor (CD32). After a single washing procedure the bound labeled ICs can be determined. To further improve type-specific reactions high concentrations of competing heterologous unlabeled ED III proteins were added to the labeled antigens.

**RESULTS:** Follow-up serum samples of 64 patients with RT-PCR confirmed primary DENV-1, -2, -3 or -4 infections were tested against four enzyme-labeled recombinant DENV EDIII antigens. Antibodies to the EDIII antigens were found in 55 patients (sensitivity 86%). A complete agreement between the serotype detected by PCR in early samples and the serotype-specific antibody in later samples was found. Type-specific anti-EDIII antibodies were first detected 9-20 days after onset of the disease. In 21% of the samples collected from people in Vietnam secondary infections with antibodies to two serotypes could be identified.

**CONCLUSIONS:** The data obtained with the ICB-ELISA show that after primary DENV infection the corresponding type-specific antibodies are detected in almost all samples collected at least two weeks after onset of the disease. The method will be of value to determine the distribution of the various type-specific anti-DENV antibodies in DENV endemic areas.

DOI: 10.1371/journal.pntd.0002580

PMCID: PMC3873247

PMID: 24386498 [Indexed for MEDLINE]

**Sensitive and specific detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV)-Specific IgM and IgG antibodies in human sera using recombinant CCHFV nucleoprotein as antigen in  $\mu$ -capture and IgG immune complex (IC) ELISA tests.**

Emmerich P(1)(2), Mika A(3), von Possel R(1), Rackow A(3), Liu Y(3), Schmitz H(1), Günther S(1), Sherifi K(4), Halili B(5), Jakupi X(6), Berisha L(5), Ahmeti S(7), Deschermeier C(3).

Author information:

(1)Department for Virology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany.

(2)Department of Tropical Medicine and Infectious Diseases, Center of Internal Medicine II, University of Rostock, Rostock, Germany.

(3)Diagnostics Development Laboratory, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany.

(4)Faculty of Agricultural and Veterinary Medicine, University of Prishtina "Hasan Prishtina", Prishtina, Kosovo.

(5)University Clinical Center of Kosovo, Infectious Diseases Clinic, Prishtina, Kosovo.

(6)Department of Microbiology, National Institute for Public Health of Kosova, Prishtina, Kosovo.

(7)University of Prishtina "Hasan Prishtina", Medical Faculty & University Clinical Center of Kosovo, Infectious Diseases Clinic, Prishtina, Kosovo.

As the most widespread tick-borne arbovirus causing infections in numerous countries in Asia, Africa and Europe, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV, family *Nairoviridae*) was included in the WHO priority list of emerging pathogens needing urgent Research & Development attention. To ensure preparedness for potential future outbreak scenarios, reliable diagnostic tools for identification of acute cases as well as for performance of seroprevalence studies are necessary. Here, the CCHFV ortholog of the major bunyavirus antigen, the nucleoprotein (NP), was recombinantly expressed in *E.coli*, purified and directly labeled with horseradish peroxidase (HRP). Employing this antigen, two serological tests, a  $\mu$ -capture ELISA for the detection of CCHFV-specific IgM antibodies (BLACKBOX CCHFV IgM) and an IgG immune complex (IC) ELISA for the detection of CCHFV-specific IgG antibodies (BLACKBOX CCHFV IgG), were developed. Test performance was evaluated and compared with both in-house gold standard testing by IgM/IgG indirect immunofluorescence (IIF) and commercially available ELISA tests (VectoCrimean-CHE-IgM/IgG, Vector-Best, Russia) using a serum panel comprising paired samples collected in Kosovo during the years 2013-2016 from 15 patients with an acute, RT-PCR-confirmed CCHFV infection, and 12 follow-up sera of the same patients collected approximately one year after having overcome the infection. Reliably detecting IgM antibodies in all acute phase sera collected later than day 4 after onset of symptoms, both IgM ELISAs displayed excellent diagnostic and analytical sensitivity (100%, 95% confidence interval (CI): 85.2%-100.0%). While both IgG ELISAs readily detected the high IgG titers present

in convalescent patients approximately one year after having overcome the infection (sensitivity 100%, 95% CI: 73.5%-100.0%), the newly developed BLACKBOX CCHFV IgG ELISA was superior to the commercial IgG ELISA in detecting the rising IgG titers during the acute phase of the disease. While all samples collected between day 11 and 19 after onset of symptoms tested positive in both the in-house gold standard IIFT and the BLACKBOX CCHFV IgG ELISA (sensitivity 100%, 95% CI: 71.5%-100.0%), only 27% (95% CI: 6.0%-61.0%) of those samples were tested positive in the commercial IgG ELISA. No false positive signals were observed in either IgM/IgG ELISA when analyzing a priori CCHFV IgM/IgG negative serum samples from healthy blood donors, malaria patients and flavivirus infected patients as well as CCHFV IgM/IgG IIFT negative serum samples from healthy Kosovar blood donors (for BLACKBOX CCHFV IgM/IgG: n = 218, 100% specificity, 95% CI: 98.3%-100.0%, for VectoCrimean-CHE-IgM/IgG: n = 113, 100% specificity, 95% CI: 96.8%-100.0%).

DOI: [10.1371/journal.pntd.0006366](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006366)

PMCID: PMC5892944

PMID: 29579040 [Indexed for MEDLINE]

Infect Genet Evol. 2018 Nov;65:6-11. doi: 10.1016/j.meegid.2018.07.010. Epub 2018 Jul 11.

**Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo.**

Emmerich P(1), Jakupi X(2), von Possel R(3), Berisha L(4), Halili B(4), Günther S(5), Cadar D(6), Ahmeti S(2), Schmidt-Chanasit J(7).

Author information:

(1)Department of Virology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Hemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg, Germany; University of Rostock, Rostock, Germany.

(2)National Institute for Public Health of Kosovo, Prishtina, Kosovo.

(3)Department of Virology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Hemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg, Germany.

(4)University Clinical Center of Kosovo, Infectious Diseases Clinic, Prishtina, Kosovo.

(5)Department of Virology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Hemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg, Germany; German Centre for Infection Research (DZIF), Hamburg, Germany.

(6)Department of Arbovirology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Hemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg, Germany; German Centre for Infection Research (DZIF), Hamburg, Germany. Electronic address: danielcadar@gmail.com.

(7)Department of Arbovirology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Hemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg, Germany; German Centre for Infection Research (DZIF), Hamburg, Germany.

Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus (CCHFV) is a tick-borne virus which causes severe disease in humans with fatality cases up to 30%. We investigated the genetic and evolutionary characteristics of CCHFV in Kosovo, in particular in humans and found that different virus variants of genotype V circulate, with Turkey as a possible origin for the progenitor of southern European CCHF outbreaks. Phylogenetic analyses also revealed a single introduction event and in situ evolution of CCHFV in this country. The viral metagenomics revealed a more abundant virome in the fatal CCHF cases and the presence of a novel tick-borne segmented RNA virus belonging to the recently discovered Jingmenvirus group which raises questions about the potential pathogenic effect of this novel virus on human and animal health.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

DOI: 10.1016/j.meegid.2018.07.010

PMID: 30006045

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig angefertigt, alle verwendeten Ergebnisse und Daten anderer vollständig angegeben und korrekt zitiert sowie jedwede weitere Mitwirkung Dritter offengelegt zu haben.

Hamburg, den 15.08.2018

Dr. Petra Emmerich-Paloh

## **Danksagung**

Hiermit danke ich all denjenigen, die mir die Entstehung und Vollendung der vorliegenden Habilitationsschrift ermöglichten. Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung durch Kollegen nicht umsetzbar gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Mitarbeiter Herrn Ronald von Possel, meinen Kollegen Dr. vet. Daniel Cadar, Prof. Dr. Dr. med. Jonas Schmidt-Chanasit und Prof. Dr. med. Herbert Schmitz, sowie meinen Technischen Assistenten und Praktikanten.

Ohne die gute Zusammenarbeit mit meinen ausländischen Kooperationspartnern, sowie der Mithilfe der betroffenen Patienten und ihren Angehörigen wären die Arbeiten ebenfalls nicht durchführbar gewesen, darum auch an all diejenigen mein herzlicher Dank.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Emil Christian Reisinger und PD Dr. Christoph Josef Hemmer der medizinischen Fakultät Rostock für die Unterstützung dieser Arbeit und den Mitarbeitern des Dekanats der Universitätsmedizin Rostock für die freundliche Hilfestellung aller formalen Anforderungen, die eine Habilitationsschrift erfordert.