

Untersuchungen zur Vektor- und Arbovirenprävalenz in Randzonen des tropischen Regenwaldes des Taï Nationalparks, Côte d'Ivoire und Charakterisierung neuer Virusisolate

vorgelegt von
Sandra Junglen
Diplom Biologin, geboren in Wittlich

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

Genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. H. Görisch
1. Gutachter: Prof. Dr. R. Lauster
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Pauli

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24.07.2007

Berlin 2007
D83

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	1
Abstract.....	2
1 Einleitung und Zielsetzung.....	3
1.1 Einleitung	3
1.1.1 Ökologische und klimatische Einflüsse auf die Verbreitung von Arboviren und Auftreten neuer Virusarten.....	3
1.1.2 Relevanz arboviraler Erkrankungen.....	5
1.1.2.1 Flaviviridae.....	7
1.1.2.2 Bunyaviridae	8
1.1.2.3 Togaviridae.....	9
1.1.2.4 Reoviridae	9
1.1.2.5 Rhabdoviridae	9
1.1.2.6 Coronaviridae	10
1.1.3 Fangmöglichkeiten arboviraler Vektoren.....	12
1.2 Gegenstand der Forschung und Forschungsziel.....	12
1.2.1 Der Tai Nationalpark.....	12
1.2.2 Forschungsziel.....	14
2 Material.....	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Puffer und Lösungen	16
2.2.1 PCR-Puffer	16
2.2.2 Zellkulturmedien	16
2.2.3 Nährmedien von Escherichia coli XL-1 blue.....	17
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.2.5 Elektronenmikroskop (Aufarbeitung, Virusreinigung)	18
2.3 Kits	18
2.4 Enzyme.....	19
2.5 Bakterienstämme	19
2.6 Plasmide	19
2.7 Zellkultur.....	19
2.7.1 Zelllinien	19
2.7.2 Medien.....	20
2.8 Technische Geräte	20
2.9 Verbrauchsmaterialien	22

3	Methoden	23
3.1	Sammeln der Proben	23
3.2	Bildung der Pools	26
3.3	Herstellung der Homogenate für die Virusisolierung	26
3.4	Virusanzucht.....	26
3.4.1	Kultivierung der Zellen	26
3.4.2	Infektion und Passagierung der Zellkultur	27
3.4.2.1	Infektion mit Homogenat aus Moskitoköpfen	27
3.4.2.2	Infektion mit Zellkulturüberstand	27
3.4.3	Virusernte	28
3.5	Titration	28
3.6	Ultrazentrifugation von Virusüberstand	29
3.7	Wachstumskinetik	29
3.8	Nachweis der Virushülle	29
3.9	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	30
3.9.1	Negativkontrastierung	30
3.9.2	Einbettung von Viruspellets und Virusschnitt	31
3.9.3	Auswertung am EM und fotografische Dokumentation.....	31
3.10	Nukleinsäureextraktion und Konzentrationsbestimmung	31
3.10.1	DNA- und RNA-Extraktion aus den Körperpools	31
3.10.2	RNA-Extraktion aus Anzuchtmaterial der Zellkultur	31
3.11	cDNA-Synthese.....	32
3.12	Auswahl sequenz-spezifischer Primer	32
3.13	Konventionelle PCR.....	33
3.13.1	Konventionelle PCR.....	33
3.13.2	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.14	Real-Time PCR (TaqMan TM)	34
3.15	Aufreinigung von DNA.....	35
3.15.1	Aufreinigung von PCR-Produkten	35
3.15.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	35
3.16	Klonierung.....	35
3.17	Plasmid-Präparation	36
3.18	Berechnung der Kopienzahl	37
3.19	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	37
3.20	Versuche zur Charakterisierung von Virusgenomen durch <i>Random Priming</i>	38
3.21	Differenzierung von DNA- und RNA-Viren und Bestimmung der Genomorientierung von RNA Viren	39
3.22	Phylogenetische Analyse.....	40
3.23	Immunfluoreszenztest	40

3.23.1	Herstellung spezifischer Antikörper.....	40
3.23.2	Immunfluoreszenztest (IFT).....	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Auswertung der Proben.....	43
4.2	PCR-Screening der gepoolten Moskitokörper	52
4.3	Suche nach und Isolierung von Viren in der Zellkultur	52
4.3.1	Anzucht von Viren aus Moskitoköpfen	52
4.3.2	Anzuchtversuche mit Virusüberständen von Pools der Zone C (Sekundärwald) auf Primatenzellen.....	56
4.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	57
4.5	PCR-Screening der CPE verursachenden Pools aus der Zellkultur	59
4.6	Charakterisierung ausgewählter Virusisolate.....	60
4.6.1	Untersuchungen des Virusisolats aus Pool B3	60
4.6.1.1	Untersuchungen in der Zellkultur	60
4.6.1.2	Molekulargenetische Untersuchungen	64
4.6.2	Untersuchungen des Pools F23	77
4.6.2.1	Molekulargenetische Untersuchungen	77
4.6.2.2	Untersuchungen in der Zellkultur	87
4.6.3	Untersuchungen des Pools B14.....	91
4.6.3.1	Untersuchungen in der Zellkultur	92
4.6.3.2	Molekulargenetische Untersuchungen	94
4.6.4	Untersuchungen des Pools F24	98
4.6.4.1	Molekulargenetische Untersuchungen	98
4.6.4.2	Untersuchungen in der Zellkultur	99
4.6.5	Untersuchungen der Pools C23 und D24	101
4.6.5.1	Untersuchungen in der Zellkultur	101
4.6.5.2	Molekulargenetische Untersuchungen	103
5	Diskussion	106
5.1	Einfluss von exogenen Faktoren auf die Vektor- und Virenprävalenz	106
5.2	Virologische Untersuchungen	113
5.2.1	Charakterisierung des Taï Forest Virus (TFV)	116
5.2.2	Untersuchungen zu dem bunavirus-ähnlichen und eines unklassifizierten Virusisolats.....	117
5.2.3	Versuche zur Charakterisierung des Orbivirus-Isolats.....	119
5.2.4	Untersuchungen des coronavirus-ähnlichen Virusisolats	120
5.2.5	Untersuchungen zur Charakterisierung der Rhabdovirusisolate.....	121
5.2.6	Erregerdichte der isolierten Viren in den verschiedenen Zonen	123
5.3	Relevanz der Ergebnisse	124
5.4	Ausblick	126

6	Literaturverzeichnis	128
7	Danksagung	138
8	Selbständigkeitserklärung.....	139
9	Lebenslauf.....	140

Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
%	Prozent
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
α	Alpha
β	Beta
λ	Lamda
Abb.	Abbildung
<i>Ae</i>	<i>Aedes</i>
AHSV	African-Horse-Sickness Virus
<i>An</i>	<i>Anopheles</i>
Arbovirus	<i>Arthropod borne virus</i>
AS	Aminosäuren
BTV	Blue-Tongue Virus
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCHFV	Crimean-Congo-Haemorrhagic-Fever Virus
CEF	primäre Hühnerfibroblasten (<i>chicken embryo fibroblasts</i>)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHIK-V	Chikungunya Virus
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CPE	cytopathischer Effekt
CTFV	Colorado-Tick-Fever Virus
CV	Chandipura Virus
<i>Cx</i>	<i>Culex</i>
DENV	Dengue Virus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
dpi	<i>days post infection</i>
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEEV	Eastern-Equine-Enzephalitis Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Forward
Fa.	Firma
FE	Fangeinheit
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GPS	<i>Global Positioning System</i>
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropanylthiogalaktosid
IRD	<i>Institute de Recherche pour le Developpment</i>
JEV	Japanisches-Enzephalitis Virus
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
LACV	La-Crosse Virus
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Männchen
m	Meter
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	<i>multiply of infection</i>
MPI EVAN	Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie, Leipzig
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NaCl	Natriumchlorid
neg	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NS	Nukleinsäure
nt	Nukleotide
OROV	Oropouche Virus

PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>pondus hydrogenii</i> , Maß für Wasserstoffionenkonzentration
pos	positiv
R	reverse
RKI	Robert Koch-Institut, Berlin
RNA	Ribonukleinsäure
Rox	5,6-Carboxy-Rhodamin
RT	Raumtemperatur
RVFV	Rift-Valley-Fever Virus
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
sec	Sekunden
SFNV	Sandfly-Fever Virus
SFV	Semikli-Forest Virus
SINV	Sindbis Virus
SLEV	St.-Louis-Enzephalitis Virus
spp	Spezies
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAHV	Tahyna Virus
TFV	Tai Forest Virus
TM	TaqMan
U	<i>units</i>
UICN	<i>Union International pour la Conservation de la Nature et de ses Ressources</i>
unbek.	unbekannt
UpM	Umdrehungen pro Minute
<i>Ur</i>	<i>Uranotaenia</i>
UV	Ultraviolett
VSV	Vesikuläres-Stomatitis Virus
VT	Volumenteile
W	Weibchen
WEEV	Western-Equine-Enzephalitis Virus
WHO	World Health Organisation
WNF	West-Nil-Fieber
WNV	West-Nil Virus
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indol- β -D-galaktopyranosid
YFV	Gelbfieber Virus
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

In einer vergleichenden Studie zur Verteilung von Arboviren und deren Vektoren in ökologisch verschiedenen Habitaten, wurden im Taï Nationalpark und umliegenden Gebieten in Côte d'Ivoire 7067 Moskitos gefangen. Die Fangorte befanden sich entlang einer gradlinigen Transsekte, die vom Primärwald über den Sekundärwald, Kaffee- und Kakao-Plantagen, Reis- und Mais-Felder bis in ein Dorf reichte. Die Moskitos wurden mit *CDC Light* und *Gravid Traps* gefangen, soweit möglich bis zur Art bestimmt und nach Art, Fangort und Geschlecht gepoolt.

Die Pools der weiblichen Moskitos wurden auf der Insektenzelllinie C6/36 und auf der Vertebratenzelllinie Vero E6/7 auf das Vorhandensein von Viren und in der PCR auf verschiedene Arboviren untersucht. Von insgesamt 437 Pools verursachten 98 einen cytopathischen Effekt (CPE) auf Insektenzellen (22,4 %). Auf Vero Zellen konnte kein CPE beobachtet werden. Dreißig Pools wurden in der Elektronenmikroskopie untersucht und Partikel an Hand morphologischer Kriterien eingeordnet. Dabei zeigte sich, dass drei Pools Rhabdoviren, sowie jeweils ein Pool ein Coronavirus, ein Bunyavirus, ein Orbivirus, ein Flavivirus und eine Vielzahl an Pools virale Partikel enthielten, die morphologisch nicht zugeordnet werden konnten. Es konnten für alle Pools mit morphologisch eingruppierbaren Viruspartikeln, außer dem Pool mit dem Coronavirus, Sequenzinformationen gewonnen werden. Sequenzhomologien zu bekannten Virussequenzen waren gering und konnten in den meisten Fällen nur auf Aminosäureebene gefunden werden. Zusammen mit den Ergebnissen weiterer molekularer und zellbiologischer Untersuchungen wird postuliert, dass es sich hier um neue Virusvarianten bekannter Virusfamilien, bzw. um Viren mit bisher unbekannten Charakteristika handelt.

Analysen zu Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Moskitozusammensetzung haben gezeigt, dass sich das ursprüngliche Klima durch die Rodung des Regenwaldes, die agrarwirtschaftliche Nutzung der gerodeten Flächen und der Konstruktion der Dörfer stark verändert hat. Der Sekundärwald, der als Übergangszone zwischen Primärwald und Plantagen angesehen werden kann, ist vermutlich die Zone, in der Erreger aus dem benachbarten Primärwald auf Vertebraten aus der Kulturlandschaft und den Dörfern treffen. In dieser Zone wurde sowohl eine erhöhte Moskitodichte, eine abrupte Veränderung in der Moskitospezieszusammensetzung, als auch eine hohe Virusprävalenz gemessen. Es ist daher zu erwarten, dass in dieser Zone für Vertebraten ein erhöhtes Risiko einer arboviralen Infektion besteht.

Abstract

As part of a comprehensive study on the distribution of arboviruses and their vectors in different ecological habitats, 7,067 mosquitoes were collected in the Taï National Park and surrounding areas in Côte d'Ivoire. Sampling points were situated along a straight transect reaching from the primary forest inside the national park through the secondary forest, coffee, cacao, rice and corn plantations to a village outside the park. The mosquitoes were captured with CDC light and gravid traps, determined to species level when possible, and pooled according to species, gender, and habitat.

Pools from female mosquitoes were examined for the presence of viruses in cell culture on C6/36 insect cells and on the vertebrate cell line Vero E6/7 and screened for several known arboviruses by PCR. From a total of 437 pools, 98 caused a cytopathic effect (CPE) on C6/36 cells (22.4 %). No CPE was observed on Vero E6/7 cells. Thirty pools were analysed by electron microscopy. According to morphological criteria three pools were positive for rhabdoviruses, one for coronavirus, one for flavivirus, one for bunyavirus, one for orbivirus and a number of pools showed uncharacterised virus-like particles. From all of these pools, except for the pool containing the corona-like virus, virus-related sequence information could be retrieved. Sequence homology to known viruses was low, and in most cases relationship was found only on amino acid level. Together with results of other molecular and cell biological investigations it is assumed that some of these viruses might be novel with new characteristics.

Analyses regarding the impact of exogenous factors on the distribution of arboviruses and their vectors suggest that through deforestation, construction of plantations and villages, the climate in these areas has changed. The secondary forest, which can be considered as intersection between primary forest and plantations, has potentially a higher risk of arboviral infections due to invasion of viruses from neighbouring zones to new habitats through an increased number of mosquitoes, an abrupt change in the mosquito species and an increased number of viruses found.

The results of this study suggest that the transition zone between tropical rainforest and plantations and villages can be considered as high-risk areas of getting arboviral infections. In the analyzed samples unexpectedly high virus prevalence was found. Since all these viruses are genetically only very distantly related to known viruses, there may be an increased risk for infections of humans and non-human primates as well as other vertebrate host species. However, the pathogenic potential of these new viruses remains to be determined.

1 Einleitung und Zielsetzung

Studien über die Arbovirenprävalenz in Westafrika sind äußerst lückenhaft und fokussieren sich zudem auf das Vorkommen bekannter Viren, wie das Gelbfieber Virus und die Dengue Viren, während und nach Epidemien in der menschlichen Bevölkerung (Akoua-Koffi *et al.*, 2001; Pisano *et al.*, 1997). Bisher wurden keine systematischen Untersuchungen auf Arboviren in Randgebieten des Regenwaldes durchgeführt. Insbesondere die Prävalenz von Vektoren und Erregern in den Grenzgebieten zwischen zwei Ökosystemen sind dabei von Interesse. Damit können Hinweise auf den Einfluss von ökologischen Veränderungen und die damit verbundenen Migrationen von Vektoren in andere Habitate und Wirtswechsel von Viren gewonnen werden.

1.1 Einleitung

1.1.1 Ökologische und klimatische Einflüsse auf die Verbreitung von Arboviren und Auftreten neuer Virusarten

Besonders die Übertragung von Erregern von nichthumanen Primaten und Nagern, so genannten Zoonosen, auf den Menschen ist zunehmend ins öffentliche Bewusstsein gerückt. Zweidrittel aller neu auftretenden Infektionskrankheiten waren in den letzten Jahrzehnten Zoonosen. Eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Erregern von einem Organismus auf den anderen spielt die Gruppe der Arboviren (ein Akronym für **Ar**thropod-**borne viruses**), bei der Erreger durch Arthropoden übertragen werden können. Eine wesentliche Ursache für das Auftreten von neuen Infektionskrankheiten und für die Veränderung der Eigenschaften bereits bekannter Viren sind das Wachstum der menschlichen Population, die zunehmende Urbanisierung, das Eindringen des Menschen in neue Ökosysteme, die erhöhte Reiseaktivität, die klimatischen Veränderungen und Probleme bei der Vektorkontrolle, sowie bei der Durchführung von Gesundheitsprogrammen. Neben Waldrodung, Wilderei und agrarwirtschaftlicher Nutzung bereits gerodeter Flächen sind der zunehmend enger werdende Kontakt von Menschen und domestizierten Tieren mit der Fauna des Regenwaldes und der stetig steigende Ferntourismus die wichtigsten Faktoren, die zur lokalen und globalen Verbreitung von Viren in neue Wirte und von Vektoren in neue Habitate beitragen. Das Eindringen von Viren in fremde Ökosysteme gilt als besonders folgenschwer, da diese Ökosysteme vollkommen naiv gegenüber dem Erreger sind und sich neue Viren möglicherweise ungehemmt ausbreiten können.

Oropouche Virus (OROV) zählt zum Genus *Bunyavirus* in der Familie der *Bunyaviridae* und

ist ein klassisches Beispiel für die Verbreitung von bisher unbekannten Viren in neuen Habitaten, auf Grund des menschlichen Eindringens in unberührte Ökosysteme. Die erste epidemische Verbreitung erfolgte im Zusammenhang mit der Rodung von Regenwald für menschliche Siedlungen. OROV wurde 1955 in Trinidad das erste Mal aus dem Blut eines Patienten mit Fieber und aus Moskitos der Art *Coquillettidia venezuelensis* isoliert (Anderson *et al.*, 1961). Eine Ausbreitung des Virus wurde zu dieser Zeit nicht beobachtet. In Brasilien wurde dann das Virus 1960 das erste Mal beschrieben, als mit dem Bau des Böhlem-Brasilia Highway begonnen wurde. Das Virus wurde aus vier Faultieren, die in Waldnähe gefangen wurden, und von Moskitos der Art *Ochlerotatus serratus* isoliert (Pinheiro *et al.*, 2004). Zwischen 1961 und 2004 breitete sich das Virus in sechs weiteren brasilianischen Staaten aus und es traten zahlreiche urbane Epidemien auf (Pinheiro *et al.*, 1962, 2004; Saeed *et al.*, 2000). Das Eindringen von Moskitos in Städte und die Einreise immunologisch-naiver Personen aus nicht-endemischen Gebieten in endemische Gebiete führte zu ausgedehnten Ausbrüchen mit hoher Infektionsrate. Über 1,5 Millionen Infektionen wurden seitdem bei Menschen registriert und damit entwickelte sich dieses Virus zu einer der größten Gesundheitsprobleme der tropischen und subtropischen Regionen Zentral- und Südamerikas (Kraus, 2007; Nunes *et al.*, 2005).

Ein weiteres Beispiel für die Veränderung der Epidemiologie von Viren durch ökologische Eingriffe ist die Ausbreitung von JEV in Asien (Simpson *et al.*, 1976). Das Virus benötigt Schweine als Amplifikationswirte und mit dem Beginn der kommerziellen Schweinezucht breitete sich das Virus über viele Regionen aus. Als zusätzlicher begünstigender Faktor kam hinzu, dass sich die Hauptvektoren (*Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnu*, *Cx. gelidus*) in stickstoffgedüngten Reisfeldern doppelt so schnell entwickeln wie in ungedüngten Feldern. Durch die Ausweitung des Reisanbaus und der Schweinezucht herrschen optimale Bedingungen für die Expansion von JEV von Indonesien nach Papua-Neuguinea, Pakistan und Indien (Mackenzie, 2005).

Wie schwer es ist, die Ausbreitung von Erregern, die in neue Ökosysteme eingeführt wurden, zu kontrollieren und einzudämmen, wird am Eindringen von West-Nil Virus (WNV) in eine bis dahin WNV-naive Population in den USA deutlich. Als Virusreservoir dienen in diesem Fall Zugvögel, und verschiedene Moskitoarten sind als Vektoren identifiziert worden, wobei ornithotrope Moskitos die Infektion von Vogel zu Vogel verbreiten und andere Moskitoarten, die an Vögeln und Vertebraten ihre Blutmahlzeiten nehmen, den Erreger auch auf den Menschen übertragen können. Wie das WNV in die USA gelangte, ist bisher ungeklärt. Der erste menschliche Fall von WNV-Erkrankung auf dem amerikanischen Kontinent trat 1999 in New York City auf. Innerhalb von vier Jahren hat sich

der Erreger von hier ausgehend über ganz Nordamerika ausgebreitet. Fälle von WNV sind 2007 in allen US-Staaten und in Kanada aufgetreten (Hayes und Gubler, 2006; Mandalakas *et al.*, 2005). Im Jahr 2002 z.B. wurden bis November in den USA 3737 Fälle von humaner WNV-Erkrankung registriert, darunter 202 Fälle mit letalem Ausgang (Krauss, 2004). Im Jahr 2003 gab es 6957 Fälle von WN-Fieber, wovon 147 verstarben. Neben Menschen können auch Hunde, Katzen und Pferde infiziert werden, die jedoch alle Endwirte sind und nicht zur Verbreitung des Virus beitragen (Austgen *et al.*, 2004). Unlängst wurde das erste Mal von einer WNV-Infektion in argentinischen Pferden berichtet (Morales *et al.*, 2006) und es wird vermutet, dass das Virus sich auch auf dem südamerikanischen Kontinent ausbreitet.

Viele ernste Epidemien zu Beginn des 18. Jahrhunderts wurden durch den Kontakt von endogenen Viren mit exogenen Wirten oder umgekehrt hervorgerufen, alle verursacht durch menschliche Aktivitäten. So wurde mit der Einfuhr der Schafe nach Schottland das durch Zecken übertragene Louping-III Virus ins Land eingeführt (Reid *et al.*, 1988). Das Omsk hämorrhagische Fieber breitete sich nach Einfuhr von 28 Bisamratten aus Nordamerika zur Fellproduktion in Sibirien und Russland aus (Burke *et al.*, 2001; Kharitonova und Leonov, 1985). Crimean-Congo-Haemorrhagic-Fever Virus und Rift-Valley-Fever Virus wurden mit Schlachtieren nach Jemen, Saudi-Arabien und die Vereinigten Arabischen Emirate eingeschleppt (Abdo-Salem *et al.*, 2006; Ergonul, 2006; Vesenjaj-Hirjan *et al.*, 1991; Hoogstraal *et al.*, 1979).

Diese Beispiele zeigen, dass eine Vielzahl von Erregern sich erst ausbreiten und zu einem gesundheitlichen Problem werden konnten, nachdem Menschen vorher stabile Ökosysteme verändert haben, die Erreger in neue Gebiete transportiert wurden und sich dort ausbreiteten. Das Potential an bisher unbekannten Viren im tropischen Regenwald ist nach wie vor nicht abzuschätzen. Es ist zu erwarten, dass sich darunter auch Erreger befinden, die bei Menschen oder Tieren zu Erkrankungen führen können. Diese Fälle zeigen die Wichtigkeit der Kenntnis von potenziellen Krankheitserregern, die in tropischen Reservoiren vorhanden sind, um Ansatzpunkte für Kontrollstrategien zu bieten.

1.1.2 Relevanz arboviraler Erkrankungen

Viren stellen immer wieder eine ernsthafte Bedrohung für die Menschheit dar, welche durch Globalisierung und Zunahme der Weltbevölkerung gewachsen ist. Eine besondere Rolle spielen dabei die Viren, die als Zoonose-Erreger von nicht-humanen Primaten, Nagern und Vögeln auf Menschen übertragen werden können. In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von solchen Fällen belegt, wie z.B. Affenpocken Virus, Ebola Virus, Marburg Virus, West-Nil Virus, Influenza Virus, HIV und Hanta Viren.

Ein besonderes Gefahrenpotential stellt dabei die Gruppe der Arboviren dar, die sowohl in Arthropoden als auch in Vertebraten replizieren. Durch Stich oder Biss können diese Erreger auf Menschen und Tiere übertragen werden. Zum Übertragungszyklus tragen nur weibliche Moskitos bei, da nur diese Blutmahlzeiten nehmen, die sie zur Eiproduktion benötigen. Die männlichen Moskitos ernähren sich ausschließlich von Pflanzensäften und besitzen keine Mundwerkzeuge, die sich zum Säugen von Blut eignen. Jedoch können einige Flavi-, Bunya- und Rhabdoviren auch transovariell übertragen werden, so dass auch männliche Moskitos mit Arboviren infiziert sein können (Anderson *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2002; Tesh und Modi, 1983; Rosen, 1981). Diese vertikale Übertragung trägt dazu bei, dass Erreger Kälte- und Trockenperioden in Moskitoeiern und Larven überdauern und sich somit in einer Population halten können (Abb. 1.1). Für Bunyaviren wird geschätzt, dass es in ca. 30 % und bei Flaviviren in ca. 1-3 % der Fälle zu einer transovariellen Übertragung kommt (Joshi *et al.*, 2002; Schopen *et al.*, 1991; Tesh, 1980; Rosen *et al.*, 1980).

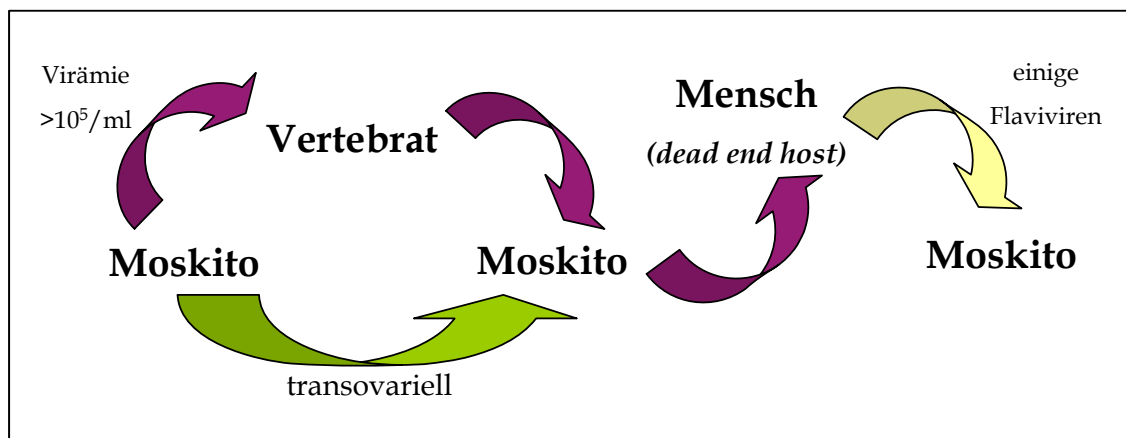


Abb. 1.1: Übertragungsketten von Arboviren. Beim sylvatischen Übertragungszyklus ist der Mensch in vielen Fällen ein Fehl-, bzw. Endwirt, da die Virämie für die Infektion von Vektoren nicht ausreicht (lila). Allerdings sind auch urbane Infektionszyklen beschrieben, bei denen sich die Vektoren wieder an den Menschen infizieren können, z.B. bei Gelbfieber Virus (gelb). Die dritte Möglichkeit der Übertragung bei Arthropoden besteht in einer transovariellen Übertragung von einer Generation auf die nächste (grün).

Arboviren gehören zu verschiedenen Virusfamilien, wie z.B. zu den Familien der *Bunya*-, *Toga*-, *Flavi*-, *Reo*-, *Rhabdo*-, *Arena*-, *Corona*- und *Orthomyxoviridae*, und stellen somit keine taxonomische Gruppe im Sinne der virologischen Klassifikation dar. Im *International Catalogue of Arboviruses* sind bisher 534 Arboviren verzeichnet, von denen 134 beim Menschen Krankheiten verursachen können (Morse und Schluederberg, 1990) und einige rufen weltweit Epidemien hervor. Die wichtigsten humanpathogenen Erreger stammen aus der Familie der *Flavi*-, *Bunya*- und *Togaviridae* (Tab. 1.1). Die meisten Arbovirusinfektionen

verlaufen bei Mensch und Tier häufig klinisch inapparent. Krankheitsbilder reichen von Fieber, Kopfschmerzen, Krämpfen, makulopapulösen Exanthemen, Enzephalitiden, bis hin zu dauerhaften Erkrankungen des Zentralnervensystems, hämorrhagischem Fieber mit Schock und tödlichem Verlauf.

Dengue und Dengue-Hämorrhagisches-Fieber (DEN), Gelbfieber (YF), Japanische-Enzephalitis (JE), St.-Louis-Enzephalitis (SLE) und West-Nil-Fieber (WNF) sind die wichtigsten durch Arboviren verursachten Krankheiten, die in den letzten Jahren ausgedehnte Epidemien ausgelöst haben. Vier verschiedene Denguevirus-Serotypen (DENV 1-4) sind bekannt, die in großen Teilen tropischer Regionen weltweit zirkulieren (Gubler, 1997). Das Virus kommt in über 100 verschiedenen Ländern vor und über 2 Milliarden Menschen leben in DENV endemischen Gebieten (Guzman *et al.*, 2002). In Südostasien und im westlichen Pazifik wurden in den letzten 20 Jahren über 6.000.000 Dengue-Fälle mit etwa 20.000 Toten registriert, wobei vorwiegend kleine Kinder erkrankten. Gelbfieber ist in Afrika immer noch ein großes Gesundheitsproblem, obwohl effektive Impfstoffe zur Verfügung stehen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass es jährlich 200.000 Gelbfieber-Fälle mit 30.000 Todesfällen gibt, von denen über 90 % in Afrika auftreten (Mutebi und Barrett, 2002; Monath, 2001). Japanisches-Enzephalitis Virus (JEV) und West-Nil Virus (WNV) können Enzephalitis verursachen und sind durch eine erhöhte Mortalitätsrate vor allem bei Kindern und alten Menschen gekennzeichnet.

1.1.2.1 *Flaviviridae*

Die Viren der Familie der *Flaviviridae*, Genus *Flavivirus*, sind umhüllte Viren mit kubischem Nukleokapsid und einem ca. 10 kb großen einzelsträngigen RNA-Genom in positiver Strangorientierung. Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von 37-50 nm. Sie bestehen aus drei Strukturproteinen, dem Kapsid-Protein, dem M-Protein und dem E-Protein. Die beiden letztgenannten sind glykosilierte Membranproteine, wobei das E-Protein die Rezeptor-bindende Domäne enthält. Die Information für die Strukturproteine befindet sich am 5'-Ende, während sich die Gene für die sieben Nichtstruktur-Proteine am 3'-Ende befinden. Das gesamte Genom wird als mRNA zur Translation eines Polyproteins genutzt, welches später proteolytisch in die viralen Strukturproteine und die Nichtstrukturproteine gespalten wird. Die Sprossung der Flaviviren erfolgt an den Membranen zytoplasmatischer Vesikel. Das Virus wird durch Lyse der Zellen freigesetzt.

Der Genus *Flavivirus* beinhaltet ca. 70 verschiedenen Viren (Murphy *et al.*, 1995; Karabatsos, 1985), die in acht serologische Komplexe eingeteilt werden. Der Prototyp dieser Gruppe, das

Gelbfieber Virus, stellt eine eigene serologische Gruppe dar (Calisher, 1989). In einer phylogenetischen Analyse der *Flaviviridae* bilden die Vektor-übertragbaren und die nicht Vektor-übertragbaren Flaviviren jeweils eine Gruppe, wobei sich die erstgenannte Gruppe in Zecken- und Moskito-übertragbare Viren aufspaltet (Kuno, 1998). Diese Einteilung an Hand des Übertragungsweges basierend auf Verwandtschaftsanalysen der Viren korreliert mit der Viruseinteilung an Hand von Antigen-Komplexen.

Flaviviren zeigen eine globale Verbreitung mit der Besonderheit, dass sich das Vorkommen einzelner Flavivirus-Spezies selten mit dem anderer überschneidet. Man geht davon aus, dass dies an der Wirkung der kreuzreagierenden Antikörper liegt, die nicht nur vor dem homologen Virustyp schützen, sondern auch gegen andere verwandte Flaviviren und somit eine Ausbreitung von neuen Viren im Ansatz hemmen. Gelbfieber Virus, Dengue Virus und Japanisches-Enzephalitis Virus verursachen jährlich große Epidemien unter der menschlichen Bevölkerung.

1.1.2.2 *Bunyaviridae*

Die Familie der *Bunyaviridae* ist eine der größten Virusfamilien und umfasst über 330 serologisch unterscheidbare Viren. Die Viruspartikel weisen ein pleomorphes Erscheinungsbild auf und besitzen einen Durchmesser von ca. 100-120 nm. Neben der typischen sphärischen Form sind im Elektronenmikroskop auch ovale und filamentöse Partikel mit einer Länge von bis zu 200 nm zu sehen (Modrow *et al.*, 2003). Bunyaviren werden in die Genera Hanta-, Nairo-, Phlebo-, Bunya- und Tospovirus unterteilt, wobei letzterer phytopathogene Viren enthält. Vertreter der Genera Nairo-, Phlebo-, Bunyavirus werden durch Arthropoden übertragen, während Nagetiere das Reservoir für Hantaviren darstellen. Jeder Genus kann in unterschiedliche Serogruppen unterteilt werden. Die Viren sind umhüllt und besitzen ein negativ orientiertes, segmentiertes RNA-Genom (Segmente L, M und S, von large, medium und small). Das L-Segment kodiert für die RNA-Polymerase und das M-Segment für die Information für ein Polyprotein zur Bildung zweier Virion-Glykoproteine Gn und Gc, die bizistronisch transkribiert und posttranslational gespalten werden. Das S-Segment enthält die Information für das Nukleokapsidprotein und ein Nichtstrukturprotein. Aufgrund des segmentierten Genoms sind die Bunyaviren zur genetischen Rekombination durch Reassortierung befähigt. Bunyaviren können transovariell und transstadial übertragen werden, wobei die virale Genexpression direkt mit der metabolischen Aktivität des Wirts zusammenhängt.

Als wichtigste Vertreter sind das La-Crosse Virus, das Crimean-Congo-Haemorrhagic-Fever

Virus, das Rift-Valley-Fieber Virus und die verschiedenen Hantaviren zu nennen. Bunyaviren sind weltweit verbreitet.

1.1.2.3 *Togaviridae*

Das umhüllte Virion der *Togaviridae* ist zwischen 45 und 75 nm groß. Das Genom besteht aus einzelsträngiger, polyadenylierter RNA mit Plus-Polarität. Das 5'-Ende trägt die Information für vier Nichtstrukturproteine, die vom Genom translatiert und proteolytisch gespalten werden. Die Gene für das Kapsid-Protein und die drei Membran-Proteine befinden sich am 3'-Ende des Genoms und werden postreplikativ translatiert. Die Viren werden durch Sprossung an der Zytoplasma-Membran freigesetzt.

Das Vorkommen von durch Togaviren verursachten Krankheiten ist weitestgehend auf die südliche Erdhalbkugel beschränkt. Allerdings sind auch Virusisolate aus Nordamerika und Skandinavien bekannt. In Afrika verursachen die Erreger von Semliki-Forest-Fieber (SFF), Sindbis-Fieber (SINF), Chikungunya-Fieber (CHIK) und O'Nyong-Nyong-Fieber teilweise große Gesundheitsprobleme unter der Bevölkerung.

1.1.2.4 *Reoviridae*

Die Viruspartikel der Familie der *Reoviridae* besitzen Genome aus segmentierter, doppelsträngiger RNA und enthalten keine Lipide und keine Hülle. Die segmentierte Genomstruktur ermöglicht genetische Rekombination (Reassortment) zwischen verschiedenen Virusstämmen. Das Kapsid ist in einen inneren und einen äußeren Teil gegliedert mit welchen jeweils vier Strukturproteine assoziiert sind. Viren, die als Erreger zoonotischer Virus-Krankheiten eine wichtige Rolle spielen, gehören dem Genus *Orbivirus* und dem Genus *Coltivirus* an, wobei die meisten Erreger des Genus *Orbivirus* durch Moskitos übertragen werden. Die humanpathogene Bedeutung dieser Viren ist gering. Jedoch besitzen einige ein enormes wirtschaftliches Gefahrenpotential, wie z.B. Blue-Tongue Virus (BTV), African-Horse-Sickness Virus (AHSV) und Epizootic-Haemorrhagic-Disease Virus (EHDV).

1.1.2.5 *Rhabdoviridae*

Die Familie der *Rhabdoviridae* umfasst sechs Genera, zwei pflanzenpathogene (*Nucleorhabdovirus*, *Cytorhabdovirus*), ein fischpathogenes (*Novirhabdovirus*) und drei tierpathogene Genera (*Lyssavirus*, *Vesiculovirus* und *Ephemeralvirus*), von denen nur

Lyssaviren und einige Vesiculoviren Zoonosen verursachen können (Tordo *et al.*, 2004). Rhabdoviren besitzen ein unsegmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Strangorientierung auf dem sich nur fünf Gene (Nukleokapsid (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Hüllprotein (G) und Polymerase (L)) befinden. Die umhüllten Viruspartikel besitzen eine patronenförmige Gestalt mit einer Länge von 180 nm und einem Durchmesser von 80 nm. Das Tollwut Virus ist der in der Menschheitsgeschichte am längsten bekannte zoonotische Erreger. Das Vesikuläre-Stomatitis Virus (VSV), das Chandipura Virus (CV) und andere Viren, die zum Genus *Vesiculovirus* gehören, spielen als humanpathogene Erreger eine Rolle und verursachten in Einzelfällen schwere Krankheitsbilder. Als Überträger werden Sandmücken und Moskitos vermutet. Rhabdoviren sind weltweit verbreitet.

1.1.2.6 *Coronaviridae*

Coronaviren hat man bis zum Auftreten von SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrom*) noch keine zoonotische Bedeutung zugeschrieben. Zu dieser Familie zählen Krankheitserreger mit erheblicher Pathogenität für Mensch und Tier. Ein Wirtswechsel konnte bisher nur unter experimentellen Bedingungen und nicht in der Natur beobachtet werden. Die Viruspartikel besitzen eine charakteristische Gestalt mit einem Durchmesser von 100-120 nm mit in die Oberfläche eingelagerten Spikes, die aus dem Rezeptor-bindenden S-Protein bestehen. Das helikale Nukleokapsid enthält ein einzelsträngiges RNA-Genom in positiver Strangorientierung mit einer Größe von 27-32 kb.

Die bisher bekannten Coronaviren werden in drei verschiedene Antigengruppen eingeteilt, wobei innerhalb jeder Gruppe die Viren nach ihrer Wirtsspezifität und Genomsequenz charakterisiert werden. Coronaviren wurden in Mäusen, Ratten, Hühnern, Schweinen, Hunden, Katzen, Hasen, Pferden, Rindern und Menschen gefunden und umfassen ein weites Spektrum an respiratorischen, gastrointestinalen, Hepatitis- und ZNS-Krankheiten. Coronaviren sind ebenfalls global verbreitet.

Tab. 1.1: Für den Menschen wichtige Arboviren.

Familie/Genus	Erreger	Vektor	Reservoir	Vorkommen
Flaviviridae/Flaviviren	Gelbfieberevirus (YFV)	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. fulcifer</i> , <i>Ae. taylori</i> , <i>Ae. mascarensis</i>	Mensch (urban), Affen (sylvatisch)	Afrika, Mittel- und Südamerika
	Dengue Virus Typ 1-4 (DENV 1-4)	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. fulcifer</i> , <i>Ae. taylori</i> , <i>Ae. albopictus</i>	Mensch, Affen	SO-Asien, Mittel- und Südamerika
	Japan.-Enzephalitis Virus (JEV)	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i> , <i>Cx. vishnu</i> , <i>Cx. gelidus</i>	Schweine, Vögel	Karibik, Afrika, polynesischen, Australien
	West-Nil Virus (WNV)	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. tarsalis</i> , u.a.		SO-Asien, Indien, China, Japan, Indonesien, Melanesien
	St.-Louis-Enzephalitis Virus (SLEV)	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Cx. tarsalis</i> , <i>Cx. nigripalpus</i>	Vögel	Afrika, Naher Osten, Nordamerika
Togaviridae/Alphavirus	Chikungunya Virus (CHIK-V)	<i>Ae. albopictus</i>	Mensch, Affen, Vögel, Fledermäuse	Afrika, Indien, SO-Asien, Indonesien
	Eastern-Equine-Enzephalitis Virus (EEEV)	<i>Culiseta melanura</i>	(Wasser-) Vögel	USA (Osten, mittlerer Westen)
	Western-Equine-Enzephalitis Virus (WEEV)	<i>Ae. sollicitans</i> , u.a.	Vögel	USA (Osten, mittlerer Westen), Kanada
	Semikli-Forest Virus (SFV)	unbek.	Nager, Vögel	Afrika
	Ross-River Virus	<i>Ae. spp</i> , <i>Cx. spp</i>	Vögel, Marsupialier	Australien, Melanesien
	Sindbis Virus	<i>Culicidae spp</i>	Vögel	Afrika, Australien, Südamerika
Bunyaviridae/Bunyavirus	O'Nyong-Nyong Virus	<i>An. gambiae</i> , <i>An. funestus</i>	unbek.	Ost- und Zentralafrika
	La-Crosse Virus (LACV)	<i>Ae. triseriatus</i> , u.a.	Mammalier	USA (mittlerer Westen, Südosten)
	Tahyna Virus (TAHV)	Moskitos	Mammalier	Europa
	Inkoo Virus	Moskitos	unbek.	Finnland, Russland
Bunyaviridae/Nairovirus	Crimean-Congo-Haemorrhagic-Fever Virus (CCHFV)	<i>Hyalomma spp.</i>	Nager, Schafe, Ziegen, Tauben	Afrika, SO-Europa
Bunyaviridae/Phlebovirus	Rift-Valley-Fever Virus (RVFV)	<i>Ae. lineatopennis</i>	Wiederkäuer	Afrika, Naher Osten
	Sandfly-Fever Virus (SFNV)	<i>Phlebotomus spp.</i>	Nager, Schafe, Ziegen	Südeuropa, SO-Europa, Parkistan, Indien, Zentralasien
Reoviridae/Coltivirus	Colorado-Tick-Fever Virus (CTFV)	<i>Demaenior andersoni</i> Moskitos	kleine Mammalier	USA (Westen), Kanada (Westen)
Rhabdoviridae/Vesiculovirus	Chandipura Virus (CHPV)	<i>Phlebotomus spp.</i>	Hühner, Rhesusaffen	Indien
	Vesikuläres-Stomatitis Virus	<i>Phlebotomus spp.</i>	Schweine	weltweit

1.1.3 Fangmöglichkeiten arboviraler Vektoren

Verschiedene Systeme zum Fangen von Moskitos, die als Vektoren eine wichtige Rolle spielen, sind bekannt. Eine der ältesten, aber bis heute eine der effektivsten Methoden, ist das sogenannte *human bait catch* oder auch als *human landing collections* bezeichnet, bei der Menschen als Lockmittel dienen (Cordellier und Akoliba, 1981). Dabei liegt ein Teil ihres Körpers frei, während der restliche Körper geschützt ist. Moskitos, die auf dem freiliegenden Teil zur Blutmahlzeit landen, werden mit einem Aspirator aufgesaugt. Da die Probanden der Gefahr einer arboviralen Infektion ausgesetzt sind, wurde versucht ebenso repräsentative und effektive mechanische Fallen zu entwickeln. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl verschiedener Fallensysteme, die Moskitos mit optischen Reizen, Duftsignalen oder Wärme anlocken und mit Hilfe von Ventilatoren, Klebeflächen oder Hochspannungsgitter abfangen. Die *Centers for Disease Control and Prevention* haben die sogenannten CDC-Fallen entwickelt, die für viele Studien verwendet werden (www.johnwhockco.com). Grundsätzlich wird zwischen Tag- und Nachtfallen unterschieden. Die Fallen, die tagsüber verwendet werden können, locken die Moskitos entweder durch eine bestimmte Farbe, z. B. durch Schwarz, oder durch CO₂ an. Zur CO₂-Bildung wird meist Trockeneis verwendet, welches sich in einem Behälter an der Falle befindet. Bei den Nachtfallen werden normale Glühlampen, Schwarzlichtlampen oder auch CO₂ als Reize verwendet. Trotz der Vielzahl unterschiedlicher Fallentypen, sind die Fangergebnisse nicht so gut wie mit der *human bait catch* Methode (Krockel *et al.*, 2006). Vor kurzem ist eine Falle entwickelt worden, die ähnlich gute Fangergebnisse erzielt wie die *human bait catch* Methode (Williams *et al.*, 2006). Bei dieser BG-Sentinel® Falle wird eine Duftwolke aus einer Mischung von auf der menschlichen Haut vorkommenden Gerüchen in einer bestimmten Form freigesetzt und die angelockten Moskitos durch einen Ventilator eingesaugt. Ein weiterer Ansatz ist das Aufstellen von kleinen Gefäßen mit Wasser und Heu. Weibliche Moskitos, die vom Geruch des Heus angelockt werden, legen ihre Eier im Wasser ab, die dann später im Labor untersucht werden können (*Ovitrap*s). Es besteht auch die Möglichkeit die Weibchen mit einem auf dem Behälter befestigten Ventilator einzufangen (*Gravid traps*).

1.2 Gegenstand der Forschung und Forschungsziel

1.2.1 Der Taï Nationalpark

Der tropische Regenwald bedeckte einst 40 Millionen Hektar in Westafrika, von denen Mitte der 80ziger Jahre nur noch 8 Millionen Hektar übrig waren (Martin, 1989). Dreiviertel dieses Waldes waren in den späten 80ziger Jahren auf Grund von Nutzholzgewinnung und

Landwirtschaft zerstört worden (Boesch *et al.* 1994). Der Taï National Park im Südwesten von Côte d'Ivoire stellt mit der Fläche von 435.000 Hektar den größten verbleibenden Bestand an tropischen Regenwald in Westafrika dar. 1978 wurde der Park zum Biosphärenreservat und 1982 von der UNESCO zum Weltkulturerbe erklärt. Die biologische Diversität an Pflanzen- und Tierarten ist mit über 870 vaskulären Pflanzen (Aké Assi und Pfeffer, 1975), 11 verschiedenen Primatenarten (Oates, 1985) und vieler anderer Tiere, außerordentlich hoch. Viele dieser Tierarten gelten als bedroht und manche von ihnen sind nur noch innerhalb der Gebiete, wo sich Forscher aufhalten, zu finden, da in diesen Gebieten kaum gewildert wird. 1979 wurde im Taï Nationalpark von Verhaltensforschern um Christophe Boesch ein Projekt zur Beobachtung freilebender Schimpansen begonnen und es wurden mit der Zeit drei Camps innerhalb des Primärwaldes errichtet. Drei habituierte Gruppen werden inzwischen täglich von Wissenschaftlern beobachtet, und das Verhalten der einzelnen Tiere wird dokumentiert (Boesch, 2000). Schimpansen sind in der Roten Liste der *Union International pour la Conservation de la Nature et de ses Ressources* (UICN) als bedrohte Tierart eingestuft. Die Zahl der Individuen in den habituierten Gruppen ist in den letzten Jahren vor allem durch Krankheiten stark dezimiert worden, wobei die Ursache eines Großteils der Todesfälle ungeklärt ist (Leendertz *et al.*, 2003, 2004b). Durch eine Infektion mit dem Ebolavirus starben 1992 und 1994 insgesamt 20 Tiere (Formenty *et al.*, 1999). Besonderes Aufsehen haben sechs Schimpansen erregt, die an einer Infektion mit einem *Bacillus anthracis* ähnlichem Erreger verstorben sind (Klee *et al.*, 2006; Leendertz *et al.*, 2004a, 2006). Es wird diskutiert, ob sich dieser Erreger durch klimatische Veränderungen bis in tropische Gebiete ausbreiten konnte oder ob es sich um ein neu entdecktes „Urwald“-Isolat handelt.

Durch die erheblichen Veränderungen im Ökosystem und die nicht mehr vorhandene Pufferzone zwischen Regenwald und Zivilisation ist eine potenzielle Eintrittspforte für neue Viren und andere Erreger geschaffen worden, welche erheblich zur Abnahme der Schimpansenpopulation beigetragen haben können. Der Wald besitzt guinesischen Charakter und ist vom Typ *Eremospatha macroparva* and *Diospyros manii* (Boesch und Boesch-Achermann, 2000). Der Primärwald ist von Sekundärwald umgeben, welcher teilweise gerodet und 1977 in den Park mit eingegliedert wurde. Das Klima ist durch zwei Trockenzeiten von Dezember bis März und von August bis September, einer Jahresdurchschnittstemperatur zwischen 24,5°C und 27,3°C und einem mittleren Niederschlag von 1800 mm gekennzeichnet (Boesch und Boesch-Achermann, 2000). Die Bevölkerung um den Park stieg von 23.000 in 1965 auf 375.00 in 1988 und zugleich auch die Fläche an Kaffee- und Kakao-Plantagen um den Park (Boesch und Boesch-Achermann, 2000).

1.2.2 Forschungsziel

Diese Studie soll Aufschluss über die Prävalenz und Artzusammensetzung von Arboviren und deren Vektoren in Grenzgebieten des ivoirischen Regenwaldes geben.

Dazu wurde der Grenzbereich des Taï Nationalparks in sechs verschiedenen ökologische Zonen eingeteilt, Forschungsstation im Primärwald (Camp), Primärwald, Sekundärwald, Kakao- und Kaffee-Plantagen, Reis- und Mais-Felder und Dorf als letzte Zone. Im Primär- und Sekundärwald erfolgt zusätzlich eine Abstufung in bis zu fünf verschiedene Höhen. An jedem Fangort sollen Temperatur und Luftfeuchtigkeit gemessen werden, um die sechs Zonen klimatisch miteinander vergleichen zu können.

Zunächst sollen die gefangenen Moskitos der einzelnen Gebiete, soweit möglich, bis auf die Art bestimmt und die Artzusammensetzung in den verschiedenen Zonen analysiert werden. Aus diesen Moskitopopulationen sollen Viren isoliert und charakterisiert werden. Die Prävalenz der Viren in den einzelnen Mosquitoarten und in den verschiedenen Zonen soll bestimmt und eine detaillierte Übersicht über die Verteilung von Arboviren und deren Vektoren in dem untersuchten Gebiet soll erstellt werden.

Anhand der Untersuchungsergebnisse soll diskutiert werden, ob sich durch das Abholzen des Regenwaldes, die Veränderung des Klimas, die veränderte Landnutzung und das zunehmende menschliche Eingreifen und Eindringen in Ökosysteme, die Prävalenz und Artzusammensetzung von Arboviren und deren Vektoren verändert haben. Inwiefern sich die Vektor- und Virenprävalenz in den zu untersuchenden Zonen verändert und ein Ausbreiten von Erregern in neue Habitate erfolgt, lässt sich allerdings nur in Langzeitstudien untersuchen.

Das Wissen über im Regenwald vorkommende Viren ist noch unvollständig, was das regelmäßige Ausbrechen von neuen Krankheiten mit oft verheerenden Folgen, wie Marburg, Ebola und Affenpocken zeigt (Lawrence *et al.*, 2005; Learned *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2004). Somit ist es von höchstem Interesse, bisher unbekannte Viren zu identifizieren, um Präventivmaßnahmen zur Gefahrenabwehr treffen zu können, bevor es zur Verbreitung und zur Infektion des Menschen mit diesen Viren kommt. Von daher sollen Versuchsansätze erarbeitet werden, die es ermöglichen neue und bisher unbekannte Erreger zu detektieren.

2 Material

2.1 Chemikalien

5-Brom-4-Chlor-3-indol- β -D-galaktopyranosid (X- Gal)	BTS-Biotech , St. Leon-Rot
5,6- Carboxy- Rhodamin (Rox)	TIB MolBiol, Berlin
Agarose	peq GOLD Universal
	Agarose, peQ Lab, Erlangen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton	Gibco BRL®, Eggenstein
Bacto-Hefeextrakt	Gibco BRL®, Eggenstein
Bromphenolblau	Bromma, Schweden
β -Propiolacton	Ferak, Berlin
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Invitrogen™, Karlsruhe
Desoxyuridintriphosphat (dUTP)	Amershan, Freiburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Merck, Darmstadt
Diethylether	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen™, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Gibco BRL®, Eggenstein
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol (RNase-frei)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Formalin	Carl Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL®, Eggenstein
Freud'sches Adjuvanz (complete & incomplete)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanylthiogalaktosid (IPTG)	BTS Biotech, St. Leon-Rot
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
L-15-Medium	Gibco BRL®, Eggenstein
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
MGB-Sonden	Applied Biosystems, UK
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt

Magnesiumchlorid (PCR)	Invitrogen™, Karlsruhe
Molekulargewichts-Standards	Gibco BRL®, Eggenstein und Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen
Primer, Sonden	TIB Molbiol, Berlin
Random Primer (Hexamer)	Metabion, Martinsried
RNase Away	Molecular Bioproducts®, San Diego
Saccharose	Merck, Darmstadt
Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton-X	Merck, Darmstadt
Trypsin	PAA, Pasching
Trypsin/ EDTA	PAA, Pasching
Wasser (DNase- frei)	Fluka, Schweiz

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 PCR-Puffer

10xNH ₄ -PCR-Puffer	Invitex, Berlin
10xRox-Puffer ohne MgCl ₂	Invitrogen™, Karlsruhe

2.2.2 Zellkulturmedien

PBS-Puffer (Phosphat-buffered saline) „mit“ Mg ²⁺ und Ca ²⁺	Eigenherstellung, RKI
8,0 g NaCl	
0,2 g KCl	
1,15 g Na ₂ HPO ₄	
0,2 g KH ₂ PO ₄	
0,1 g CaCl ₂	
0,1 g MgCl ₂	
ad 1 l aqua bidest, pH 7	

PBS-Puffer (Phosphat-buffered saline) „ohne“	Eigenherstellung RKI
8,0 g NaCl	
0,2 g KCl	
1,44 g Na ₂ HPO ₄	
0,24 g KH ₂ PO ₄	
ad 1 l aqua bidest, pH 7,2	
Saccharoselösung (w/v)	Eigenherstellung RKI
360 g Saccharose	
ad PBS “ohne” 1 l	

2.2.3 Nährmedien von Escherichia coli XL-1 blue

Luria-Bertani (LB)-Medium	Eigenherstellung RKI
10 g Bacto- Trypton	
5 g Bacto- Hefeextrakt	
10 g NaCl, ad 1 l aqua bidest, pH 7	
LB-Agar	Eigenherstellung RKI
10 g Bacto-Trypton	
5 g Bacto-Hefeextract	
10 g NaCl, 15 g Agar,	
ad 1 l aqua bidest, pH 7	
Ampicilin	10mg/ml (in LB-Platten enthalten)
X-Gal	200mg/ml
IPTG	0,1M

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)	Eigenherstellung RKI
242 g Tris- Base	
57,1 ml Eisessig	
100 ml 0,5 M EDTA	
ad 1 l aqua bidest, pH 8	
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml

Ladepuffer (6x)

Eigenherstellung RKI

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

2 mM EDTA

15 % (v/v) Glycerin

0,1 % Bromphenolblau

2.2.5 Elektronenmikroskop (Aufarbeitung, Virusreinigung)

Phosphatpuffer

Eigenherstellung RKI

94 g NaH₂PO₄ H₂O

ad 1 l aqua bidest, pH 7,3

Uranylacetat (UAc) 1 % (w/v)

Eigenherstellung RKI

0,1 g Uranylacetat-Dihydrat

ad 10 ml aqua bidest

2.3 Kits

ABI PRISM™ AmpliTaq® FS BigDye 3.1 Terminator

Applied Biosystems

Weiterstadt

Expand High Fidelity PCR System

Roche Diagnostics,

Mannheim

Invisorb TwinSpin Cell Mini Kit

Invitex, Berlin

Jet Quick Gel Extraction Spin Kit

Genomed GmbH, Bad

Oeynhausen

NucleoSpin® Plasmid Kit

Macherey Nagel, Düren

QIAquick® PCR Purification Kit

Qiagen GmbH, Hilden

QIAamp Viral RNA Mini Kit

Qiagen, Hilden

Superscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit

Invitrogen™, Karlsruhe

TOPO TA Cloning Kit

Invitrogen™, Karlsruhe

Tri Reagent® RNA/DNA/Protein Isolation Reagent

Molecular Research Center,

USA

Universal RiboClone® cDNA Synthesis System

Promega, USA

2.4 Enzyme

DNase	Ambion, UK
Platinum® <i>Taq</i> DNA- Polymerase	Invitrogen™, Karlsruhe
RNase A	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> - DNA- Polymerase	Invitex, Berlin

2.5 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> XL-1 blue	Gibco BRL®, Eggenstein
-----------------------------------	------------------------

2.6 Plasmide

pEMBLE	Invitrogen™, Karlsruhe
pCR2.1 Vektor	Invitrogen™, Karlsruhe

2.7 Zellkultur

2.7.1 Zelllinien

C6/36	Moskitozellen aus der <i>Aedes albopictus</i> Larve, Klon C6/36 ECACC Nr.: 89051705
VeroE6/7	Zelllinie aus Nieren der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Ceropithecus aethiops</i>); ECACC Nr.: 85020205
VeroB4	Epithelzelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Ceropithecus aethiops</i>); DSMZ ACC 33
293	„Graham“; humane embryonale Nierenzellen, ECACC Nr.: 85120602
A549	humane Lungenkarzinomzelllinie, ECACC Nr.: 86012804
HEp2	humane Cervixkarzinomzelllinie, HeLa Derivat, ECACC Nr.: 86030501
BHK 21	Epithelzelllinie aus Nieren des syrischen Hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>), Klon 13, ECACC Nr.: 85011433

2.7.2 Medien

293	D-MEM, 1 % Glutamin, 5%FKS
A549	D-MEM, 1 % Glutamin, 5%FKS
BHK	D-MEM, 1 % Glutamin, 10%FKS
C6/36	L-15-Medium, 1 % Glutamin, 5% FKS
HEp2	D-MEM, 1 % Glutamin, 5%FKS
CEF	D-MEM, 1 % Glutamin, 10%FKS
Vero E6/7	D-MEM, 1 % Glutamin, 10%FKS
Vero B4	D-MEM, 1 % Glutamin, 10%FKS

2.8 Technische Geräte

ABI Prism™ 7500 Real Time PCR System (TaqMan™)	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI Prism™ 7900 H Sequence Detection System (TaqMan™)	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Sequenziergerät)	Applied Biosystems, Weiterstadt
CDC Miniature Light Trap Model 512	John W. Hock Company, USA
CDC Gravid Trap Model 1712	John W. Hock Company, USA
Digitalkamera Power Shot A95	Cannon, Amsterdam
Einmal-Injektions-Kanüle Sterican (0,90x40)	B.Braun, Melsungen
Elektronenmikroskop EM10A	Zeiss, Oberkochen
Federstahl-Pinzette (spitz)	Carl Roth, Karlsruhe
Finnpipette®	Thermo Electron, Waltham, USA
Gelelektrophorese Ampergerät ST 304	Gibco BRL®, Eggenstein
Gelelektrophorese-Kammer, Horizon 58	Gibco BRL®, Eggenstein
Lichtmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Mikrohomogenisator (Rotilabo®)	Carl Roth, Karlsruhe
Mikroskopierschere (gerade)	Carl Roth, Karlsruhe
Mikrowelle Privileg 8520	Privileg, Fürth
Omnifix® -F 1ml Spritze	B.Braun, Melsungen
Pipettboy	Tec No Mara AG, Zürich

Pipetten	Gilson, Abimed Analysen Technik, Langenfeld und Eppendorf, Hamburg
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttler Lab- Shaker	Kühner, Schweiz
Skalpell	Carl Roth, Karlsruhe
Spectrophotometer Coulter DU 640 B	Beckman, Krefeld
Sterilbank HERA Safe	Heraeus, Hanau
Tischwaage	Sartorius, Göttingen
Transiluminator Herolab EASY RH- 3	Herolab, Wiesloch
Ultraschallgerät Branson Sonifier 450	G. Heinemann, Schwäbisch- Gmünd
Videodokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Vortexer Type REAX 2000	Heidolph, München
Wasserbad	P-D Indurtriegesellschaft GmbH Dresden
Wetterstation (Messung von Temperatur und Luftfeuchtigkeit)	Globetrotter, Berlin
Zellkultur-Inkubator	Heraeus, Hanau und CO2 Inkubator MCO-20AIC, Sanyo, Japan
Zellzählkammer (Neubauer)	Blaub GmbH & Co. KG, Wertheim
Zentrifugen	
Laborzentrifuge Labofuge 400e	Heraeus, Hanau
Laborzentrifuge Heraeus Sepatech	Heraeus, Hanau
Laborzentrifuge Centrifuge 5402 PA	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3S-R	Kendro Laboratory Products, Osterode
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima LE 80-K	Beckman, Krefeld

Zykler

Gene Amp PCR- System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Mastercycler ep gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermal Cycler MJ Research PTC- 200	Biozym, Oldendorf
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, USA

2.9 Verbrauchsmaterialien

Cryo Tubes (1, 2 ml)	Nunc™, Wiesbaden
EM-Trägernetze, Kupfer (3,05 mm; 300 und 400 mesh)	Plano, Marburg
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP, Schweiz
Lochplatten für TaqMan- PCR (96-Well) und Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Weiterstadt
Optical Tubes und Caps für TaqMan- PCR	Applied Biosystems, Weiterstadt
Parafilm	American National Can, USA
Pipetten für Zellkultur (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Nunc™, Wiesbaden
Pipettenspitzen für Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Rapidozym GmbH, Luckenwalde
6,- 24-, 96- Well-Platten	TPP, Schweiz
Zahnstocher	BTS Biotech, St- Leon- Rot
Zellkulturflaschen Nunclon (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Nunc™, Wiesbaden
Zellschaber (14 cm, 24 cm, 32 cm)	TPP, Schweiz

3 Methoden

3.1 Sammeln der Proben

Der erste Teil der Promotionsarbeit befasste sich mit dem Sammeln der Proben im Taï National Park und angrenzender Agrarflächen und Dörfer in Côte d'Ivoire, von Anfang Februar bis Ende Mai 2004.

Die Moskitos wurden mit zwei verschiedenen Fallentypen (CDC *Light Trap*, Abb. 3.1, CDC *Gravid Trap*, Abb. 3.2) gesammelt. Zum einen waren dies Nachtfallen, bei welchen die Moskitos durch eine Lichtquelle angelockt und durch einen kleinen Ventilator in einen Auffangbehälter befördert wurden (Abb. 3.1). Zusätzlich wurden verschiedene Lockmittel (CO₂, Octanol und getragene Socken) an den Fallen angebracht und in aufeinander folgenden Nächten verwendet. Zum anderen wurden *Gravid Traps* verwendet, welche als Lockmittel eine zuckerhaltige Wasserlösung enthielten, von der Weibchen zur Eiablage angelockt und ebenfalls durch einen kleinen Ventilator in einen Auffangbehälter befördert wurden (Abb. 3.2).



Abb. 3.1: Abgebildet ist eine *Light Trap*, mit welcher nachts Moskitos durch Licht und Lockstoffe angelockt und gefangen wurden.



Abb. 3.2: Auf dem Foto erkennt man eine *Gravid Trap*, welche vorwiegend in den Morgenstunden Moskitoweibchen zur Eiablage anlockte.

Zur Festlegung der Punkte an denen die Fallen aufgestellt werden sollten, wurde mittels GPS (*Global Positioning System*) eine gradlinige Transsekte von dem Nordcamp (AI) im Primärwald bis zu einem Dorf (FII) außerhalb des Regenwaldes gelegt (Tab. 3.1, Abb. 3.3). Somit dienten als Fangorte das Camp selber, drei verschiedene Punkte im Primärwald, drei verschiedene Punkte im Sekundärwald, an den Nationalpark angrenzende Agrarflächen mit

Hochkulturen (Kakao und Kaffee), sowie an die Hochkulturen angrenzende Agrarflächen mit Niedrigkulturen (Mais und Reis). Den letzten Punkt der Linie stellte das Dorf Gouléako dar. Zusätzlich wurden noch Fangorte, die nicht auf der Transsekte lagen, als unabhängige Vergleichspunkte ausgewählt. So wurden Fallen an drei weiteren Camps, an zwei Stellen im Primärwald und in der Kleinstadt, Taï, eingesetzt.

Tab. 3.1: Bezeichnung der einzelnen Fangorte und Angabe der GPS Daten.

Abkürzung	Fangort	Zone	Longitude	Lattitude
AI	Nordcamp	Camp	5,86767554	-733968803
AII	Barrage	Camp	5,87235332	-7,33774074
AIII	Station	Camp	5,83327353	-7,34220930
AIV	Camp Noë	Camp	5,84151328	-7,34666177
BI	<i>Dialium aubrevelli</i>	Primärwald	5,86350739	-7,35515901
BII	<i>Parinari excelsor</i>	Primärwald	5,86298704	-7,35587248
BIII	<i>Parkia bicolor</i>	Primärwald	5,86266518	-7,35780903
BIV	<i>Ficus elasticoides</i>	Primärwald	5,86294949	-7,35530385
BV	<i>Piptadeniastratum africanum</i>	Primärwald	5,86287975	-7,35483178
CI	<i>Myrianthus arborus</i>	Sekundärwald	5,84795058	-7,38078483
CII	<i>Albisia gisia</i>	Sekundärwald	5,84979594	-7,37809190
CIII	<i>Strombosia pustilata</i>	Sekundärwald	5,84871769	-7,38030204
DI	Kakao	Plantage	5,83935142	-7,39825674
DII	Kaffee	Plantage	5,83680868	-7,40369090
EI	Reis	Feld	5,83621323	-7,40428098
EII	Mais	Feld	5,83681941	-7,40369090
FI	Taï	Kleinstadt	5,87468348	-7,45474125
FII	Gouléako	Dorf	5,83436787	-7,41086313

Im Primär- und Sekundärwald wurden die Fallen in fünf (1 m, 8 m, 16 m, 24 m und 32 m Höhe), bzw. in drei (1-16 m) verschiedenen Höhen an verschiedenen Baumarten angebracht (Tab. 3.1, Abb. 3.3 a), da die stockwerkartige Segmentierung des Regenwaldes unterschiedliche Tierarten- und Insektenarten beinhaltet. Die Fallen wurden hierzu mit einem Seilsystem in die entsprechende Höhe gezogen.

Die Nachtfallen wurden jeweils abends um 18.30 Uhr vor Einbruch der Dunkelheit aufgehängt und am folgenden Morgen um 6.30 Uhr nach Sonnenaufgang wieder abgenommen. Die *Gravid Traps* wurden morgens um 6.00 Uhr aufgestellt und am selben Tag abends um 18.00 Uhr geleert. Somit betrug eine Fangereinheit (FE) jeweils 12 Stunden. Die Fallen wurden für jeden Standort in der Regel an drei hintereinander folgenden Tagen aufgestellt. Zusätzlich wurden zur Messung von Temperatur und Luftfeuchtigkeit an den Fallen ein entsprechendes Messgerät angebracht. Es wurden die maximalen und minimalen Werte aufgezeichnet.

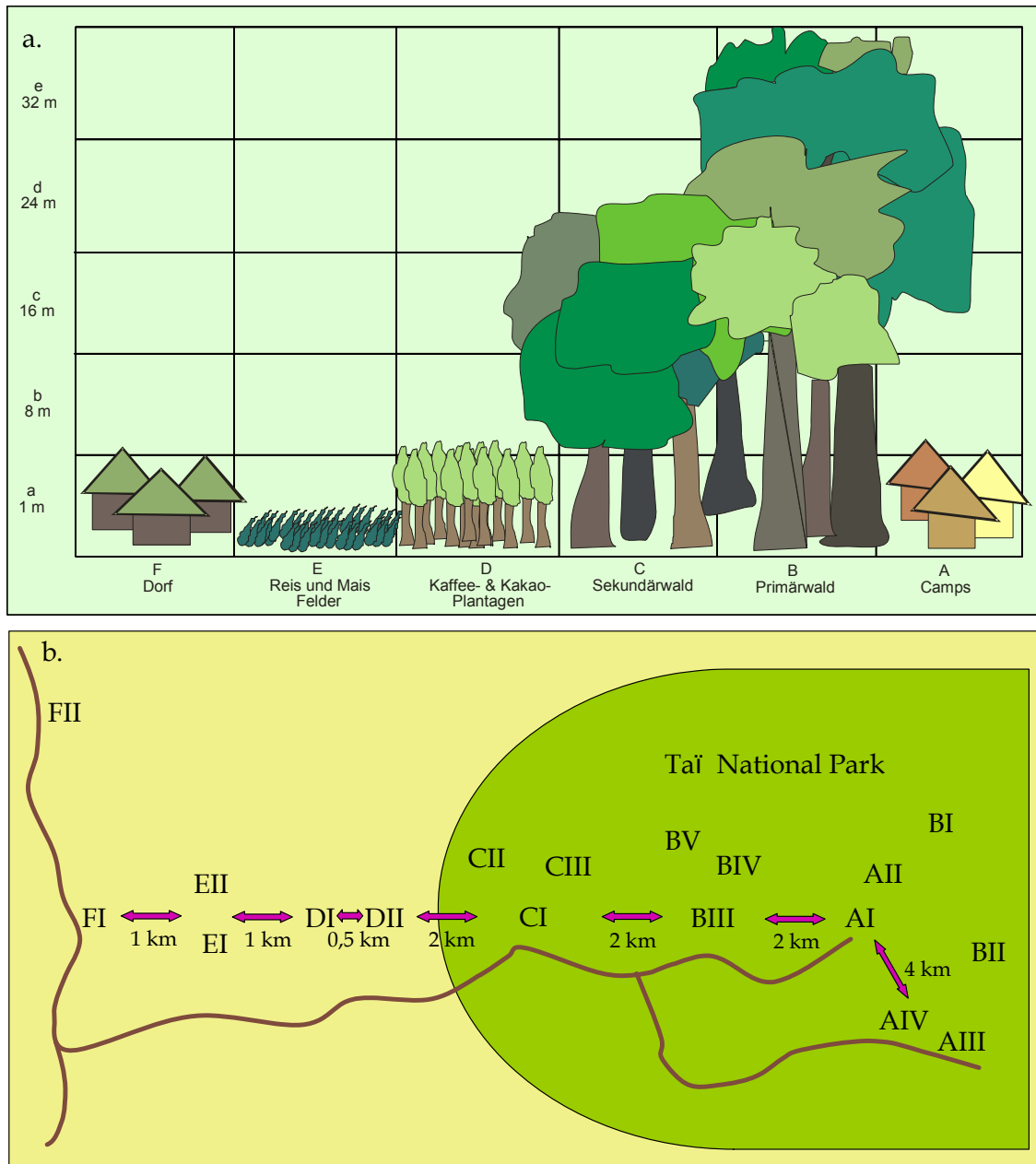


Abb. 3.3: Dargestellt sind die sechs verschiedenen Zonen (F-A) in denen die Moskitos gefangen wurden. a. Im Primär- und Sekundärwald wurden die Fallen in fünf, bzw. in drei verschiedenen Höhen befestigt. b. Eingezeichnet sind die einzelnen Fangorte der sechs Zonen. Die braune Linie stellt die Piste dar.

Die Bestimmung der gefangenen Moskitos erfolgte mittels eines Binokulars und Bestimmungsliteratur von Jupp (1996), Gillies und Coetzee (1987), sowie Gillies und Meillon (1968) im Camp. Der Großteil der Proben wurde in Flüssigstickstoff konserviert. Zur späteren Überprüfung der Speziesbestimmung wurden von jeder Art einige Exemplare in Alkohol und als Trockenpräparate konserviert. Mittels Digitalkamera wurden auch Aufnahmen der einzelnen Spezies durchs Binokular gemacht. Die gefangenen Moskitos wurden nach Art, Geschlecht, Fangort und -höhe und Vitalität, d.h. ob sie bei Leerung der Falle tot oder lebendig waren, sortiert und in Cryo Tubes in Flüssigstickstoff gelagert.

3.2 Bildung der Pools

Die vorsortierten Proben wurden am RKI zu Pools von in der Regel bis zu 20 Tieren zusammengefasst. Einzelne Arten, von denen besonders viele Tiere gefangen wurden, wurden teilweise in Pools von bis zu 50 Tieren vereinigt. Arten, die nur vereinzelt gefangen wurden, wurden miteinander gruppiert. Alle Pools wurden in Kopf- und Körperpools geteilt, wobei der Kopf der Moskitos mit einer Schere vom Rumpf abgetrennt wurde. Für jeden Pool wurden eine frische Pinzette und Schere verwendet, die nach Gebrauch mit Lysoform gereinigt und autoklaviert wurden.

3.3 Herstellung der Homogenate für die Virusisolierung

Ein Pool von Moskitoköpfen wurde unter Verwendung eines Mikrohomogenisators mit 300 µl kaltem D-MEM Medium ohne Zusatz in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß zermörsert. Sobald keine größeren Bestandteile mehr zu erkennen waren, wurden 1,2 ml D-MEM Medium ohne Zusatz zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 5000 UpM bei 4°C in einer Eppendorf Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Dieses Eluat wurde sofort für die Infektion von Zellen verwendet.

3.4 Virusanzucht

3.4.1 Kultivierung der Zellen

Alle verwendeten Zelllinien, C6/36, VeroE6/7, VeroB4, BHK, 293, A549, HEp2 und CHF sind adhärent wachsende Zellen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage, je nach Zelldichte zwischen 1:3 und 1:5 umgesetzt. Die C6/36 Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst. VeroB4, BHK und CEF Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, während VeroE6/7, 293, A549 und HEp2 Zellen mit Trypsin/EDTA (1:2) abgelöst wurden. Die abgelösten Zellen wurden mit frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation der C6/36 Zellen erfolgte bei 28°C ohne CO₂-Begasung, die der anderen Zellen bei 37°C mit 5% CO₂-Begasung in einem Zellkultur-Inkubator.

3.4.2 Infektion und Passagierung der Zellkultur

Alle Arbeiten zur Anzucht und Kultivierung von Virusisolaten aus Moskitos erfolgten unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 3 (BG Chemie), da unbekannt war, ob die Erreger menschenpathogen waren und nicht abgeschätzt werden konnte, wie hoch das Gefährdungspotential war.

3.4.2.1 Infektion mit Homogenat aus Moskitoköpfen

Am Vortag der Infektion wurden 3×10^5 C6/36, 5×10^4 VeroE6/7, bzw. 4×10^5 CEF Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Infektion erfolgte jeweils als Doppelansatz und auf zwei verschiedenen Zelllinien bei 70-80 % Konfluenz. Pro Platte wurden sechs Pools getestet. Bei den Pools der Zonen FI, D, E und C erfolgte die Infektion auf C6/36 Zellen und CEF. Der Überstand wurde zwei Mal auf frische Zellen passagiert, wobei die zweite Passage des Überstands aus der C6/36 Zellkultur auf VeroE6/7 Zellen erfolgte. Die später untersuchten Pools aus den Zonen A, B und FII wurden nur noch parallel auf C6/36 und VeroE6/7 Zellen gegeben und zwei Mal auf frische Zellen passagiert, da bei den zuerst getesteten Proben die Anzucht auf CEF stets negativ war.

Das Medium wurde von den Zellen genommen und 200 µl Medium ohne Zusatz, D-MEM bei VeroE6/7, bzw. CEF und L-15 bei C6/36, auf die Zellen gegeben. Je 100 µl des Moskitohomogenats wurden auf die Zellen gegeben und diese dann 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 700 µl Medium mit FKS auf die Zellen gegeben und diese für 8 Tage inkubiert. Die Zellen wurden täglich nach cytopathischen Effekten (CPE) mikroskopisch untersucht.

3.4.2.2 Infektion mit Zellkulturüberstand

Am Vortag der Infektion wurden die Zellen in 24-Well-Platten so ausgesät, dass eine Konfluenz von 70-80 % vorlag. Das Medium wurde von den Zellen genommen, 100 µl an Überstand der vorherigen Kultur auf die Zellen gegeben und die Zellen mit 200 µl Medium ohne Zusatz bedeckt, so dass sie während der einstündigen Inkubationszeit nicht austrockneten. Anschließend wurde ausreichend Medium mit Zusatz, z.B. 1 ml Gesamtvolumen an Medium pro Kavität der 24-Well-Platte, auf die Zellen gegeben und bis zur Ausprägung eines deutlichen CPEs im Zellkultur-Inkubator kultiviert.

3.4.3 Virusernte

Wenn ein deutlicher CPE bei 80-100 % der Zellen zu erkennen war, erfolgte die Ernte. Dabei wurde bei den 24-Well-Platten der Überstand der Doppelansätze vereinigt und die Zellen mit einer Pipettenspitze abgeschabt und zum Überstand gegeben. Diese Suspension wurde in mehrere Aliquots aufgeteilt und bei -70°C gelagert. Eine Pelletierung der Zelldebris erfolgte nach Auftauen der Suspension vor der Infektion neuer Zellen. Bei der Ernte aus Zellkulturflaschen wurde der Überstand bis auf 2-5 ml je nach Flaschengröße abgenommen und in je nach Menge in 15, bzw. 50 ml Falconröhrchen überführt. Das restliche Medium in den Flaschen wurde auf den Zellen belassen und für 10 min bei -70°C gefroren, um die Zellen zu zerstören. Beim Auftauen wurden die Zellen mit dem gefrorenen Medium durch Schütteln der Flasche von der Oberfläche abgelöst und ebenfalls in das Falconröhrchen gegeben. Durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 UpM bei RT in der 3S-R Multifuge wurden Zellreste pelletiert und der Überstand für weitere Versuche aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Menge an infektiösen Viren wurde durch Titration auf C6/36 Zellen ermittelt.

3.5 Titration

Um mit einer standardisierten Virusmenge infizieren zu können, wurden Virusstocks titriert. Die Titration erfolgte auf 96-Well-Platten in 5-fach Ansätzen. Dazu wurden 1×10^4 C6/36 Zellen pro Kavität in 100 µl Medium ausgesät. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-8} von virushaltigem Zellkulturüberstand in L-15 Medium ohne Zusatz hergestellt und jeweils 100 µl pro Verdünnungsstufe auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 7 Tage bei 28°C inkubiert und danach mikroskopisch ausgewertet. Jene Verdünnung, bei der 50 % der Zellkulturen einen CPE aufweisen, ist eine TCID₅₀ (*tissue culture infectious dose 50 %*). Der Virustiter wurde nach folgender Gleichung berechnet (Reed und Muench, 1938):

$\text{Titer/ml} = \frac{D^{(n/p + 0,5)}}{D_0 \times D \times V}$	D = Verdünnungsfaktor n = Anzahl positiver Wells auf gesamter Platte p = Anzahl Parallelbestimmungen D₀ = erste Verdünnungsstufe (unverdünnt = 1, 1:10 verdünnt = 0,1 usw. V = eingesetztes Volumen an Virusverdünnung in ml
---	---

3.6 Ultrazentrifugation von Virusüberstand

Um Virus aufzukonzentrieren, wurde eine 175 cm² Flasche infiziert, die Zellen wie unter 3.4.3 beschrieben geerntet und der virushaltige Zellkulturüberstand über 5 ml einer 36 %igen Saccharoselösung für 4 h bei 28.000 UpM in einer Beckmann Ultrazentrifuge (Rotor SW 32 Ti) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgekippt und das Pellet 10 min bei RT stehen gelassen. Das Pellet wurde über Nacht bei 4°C in 150 µl PBS „ohne“ gelöst und zur EM Diagnostik und Nukleinsäureextraktion verwendet.

3.7 Wachstumskinetik

Um das Wachstumsverhalten von Viren zu untersuchen, wird die Replikation bis zum Erreichen des Titerplateaus, d.h. dem Zeitpunkt an dem der maximale Virustiter erreicht ist, beobachtet.

Dazu wurden 1x10⁶ C6/36 Zellen pro Kavität einer 6-Well-Platte ausgesät und in Doppelwerten mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,01 in 300 µl Medium ohne Zusatz infiziert. Die Zellen wurden für 2 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium komplett abgenommen, die Zellen mit 1 ml PBS „ohne“ gewaschen und 3 ml frisches L-15 Wachstumsmedium zugegeben. Folgend wurden pro Untersuchungszeitpunkt 140 µl Überstand für die RNA-Extraktion und 60 µl Überstand für die Titerbestimmung abgenommen und bei -70°C gelagert. Die Probennahme erfolgte bei Pool B3 täglich von 0-10 dpi und bei Pool F23 bei 0, 2, 4, 6 und 8 dpi, wobei hier keine Titration erfolgte, weil in diesem Pool mehrere Viren vorhanden sind (s. 4.6.2.2.3). Nach der Ernte der Kulturen erfolgte die Titration der Überstände des Pools B3 und die RNA-Extraktion und cDNA-Synthese der Überstände der Pools B3 und F23. Die Quantifizierung der Genomkopien erfolgte mit der für die jeweiligen Viren spezifischen *Real-Time* PCR.

3.8 Nachweis der Virushülle

Durch eine Behandlung mit Äther wird üblicherweise überprüft, ob Viren eine Lipidhülle besitzen (Iwanowicz und Goodwin, 2002; Lu und Loh, 1992). Ist nach der Behandlung kein infektiöses Virus mehr vorhanden, so hat es die Lipidhülle verloren. Bleibt es infektiös, handelt es sich um ein unbehülltes Virus.

Hierzu wurden 1x10⁴ C6/36 Zellen pro Kavität auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Virushaltiger Zellkulturüberstand wurde 1:10 in L-15 Medium ohne Zusatz verdünnt und 1:1 mit 300 µl Diethyläther versetzt und 5 min per Hand auf Eis geschüttelt. Eine Trennung

der Phasen erfolgte durch eine Zentrifugation bei 3000 UpM bei 4°C für 10 min (Tischzentrifuge Centrifuge 5415C). Die obere Ätherphase wurde vorsichtig und möglichst komplett abgenommen. Die untere Phase wurde in Doppelansätzen von 10^{-1} bis 10^{-3} titriert. Parallel wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der 1:10 in L-15 Medium verdünnter virushaltiger Zellkulturüberstand ohne Äther geschüttelt wurde. Nach 7 Tagen wurden die Zellen der Titration von Äther-behandelten und unbehandelten Proben mikroskopisch ausgewertet und 140 µl Überstand der 10^{-1} Verdünnung der Titration von Äther-behandelten und unbehandelten Proben zur RNA-Extraktion verwendet. Es wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und diese mittels *Real-Time* PCR auf das Vorliegen der gesuchten Genomfragmente getestet.

3.9 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.9.1 Negativkontrastierung

Die Untersuchungen der Anzuchtversuche im Elektronenmikroskop und die fotografische Darstellung wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Kurth (Robert Koch-Institut, ZBS1) durchgeführt.

Für eine optimale Darstellung der Viren und die Erkennung von Strukturdetails in der Elektronenmikroskopie müssen Schwermetallsalze (Uran, Blei, Osmium, Wolfram usw.) auf oder in die Probe gebracht werden, um so die Elektronendichte zu erhöhen und damit zusätzlichen Kontrast einzuführen. Es wurde die Methode der Negativkontrastierung angewendet, bei der die Auflösung der Proben bis in den 2 nm-Bereich ausgewertet werden können. Hierbei erhält man eine genaue Abbildung der Viruspartikel, aber es können auch innere Virusstrukturen ausgemacht werden, wenn das Kontrastmittel in das Virus eingedrungen ist.

Die Aufarbeitung der im Labor der Sicherheitsstufe 3 mit 2 % Paraformaldehyd fixierten Proben erfolgte nach dem Protokoll von Biel (1999) unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 in einem Labor der Sicherheitsstufe 1. Von der jeweiligen Virussuspension wurden 3-5 µl auf ein frisch beglimmtes Grid aufgebracht und dort für 1-3 min adsorbiert. Die Flüssigkeit wurde mit einem Streifen Filterpapier abgesaugt und das Grid für 5 sec durch Ablegen auf der Oberfläche eines Tropfens Aqua bidest gewaschen und das Wasser wieder mit einem Streifen Filterpapier abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde zwei- bis viermal wiederholt. Anschließend wurde das Grid je nach Adsorptionsmenge des Ausgangsmaterials für 5-20 sec auf einen Tropfen Kontrastmittel (Uranylacetat, pH 4,4) gelegt. Das Kontrastmittel wurde nach der Inkubationszeit mit einem angefeuchteten Stück

Filterpapier teilweise abgesaugt und das Grid an der Luft getrocknet.

3.9.2 Einbettung von Viruspellets und Virusschnitt

Das pelletierte Virus aus einer 175 cm² Zellkultur-Flaschen wurde mit 2 % PFA überschichtet, über Nacht fixiert und noch mal in der Ultrazentrifuge pelletiert (1 h, 100.000xg, 4°C). Das entstandene Viruspellet wurde mit 3 % LMP-Agarose (Low Melting Point-Agar) überschichtet, geteilt und in PBS „ohne“ bei 4°C aufbewahrt. Die weitere Behandlung erfolgte nach dem Einbettungs- Standardprotokoll für Ultradünnschnitt TEM (Hayat, 2000).

3.9.3 Auswertung am EM und photographische Dokumentation

Die negativ kontrastierten Präparate und Ultradünnschnitte der Viruspellets wurden an einem Zeiss EM 10 A Transmissions-Elektronenmikroskop bei einer Primärvergrößerung von 5000:1 bis 40000:1 und einer Beschleunigungsspannung von 80 kV unter Verwendung der 30 µm Objektivapparat-Kontrastblende ausgewertet. Die Befunde wurden mit einer Digitalkamera dokumentiert.

3.10 Nukleinsäureextraktion und Konzentrationsbestimmung

3.10.1 DNA- und RNA-Extraktion aus den Körperpools

Die DNA- und RNA-Extraktion erfolgte mit einigen Änderungen nach dem Protokoll des Twin Spin Cell Mini Kits (Invitrogen), wobei DNA und RNA einer Probe parallel und durch unterschiedliche Affinitätssäulen getrennt extrahiert werden können. Die Moskitos eines Pools wurden mit 450 µl Lysis-Puffer versetzt und mit dem Mikrohomogenisator zermörsert. Die Probe wurde bei 3000 Upm 10 min zentrifugiert (Multifuge 3S-R), um größere Partikel zu pelletieren. Der Überstand wurde laut Protokoll des Herstellers weiter verarbeitet und das Pellet bei -70°C gelagert. Zur Elution der RNA wurde statt des Elutionspuffers tRNA gelöst in RNase freiem Wasser verwendet und die RNA anschließend bei -70°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde im Photometer bestimmt und bei -20°C gelagert.

3.10.2 RNA-Extraktion aus Anzuchtmaterial der Zellkultur

RNA wurde mit Hilfe des Viral RNA Kits (Qiagen) extrahiert. Hierzu wurden im L3-Labor 140 µl des Zellkulturüberstands in 560 µl AVL-Puffer aufgenommen was zur Inaktivierung von Viren führte. Die weiteren Schritte der Extraktion erfolgten unter S1 Bedingungen. Die Elution erfolgte mit 2x 40 µl AVE-Puffer. Sollte die RNA zur nicht sequenzspezifischen Amplifikation von Virussequenzen (*Random Priming*) verwendet werden, wurde ein Mal mit

60 µl AVE-Puffer eluiert.

3.11 cDNA-Synthese

Die extrahierte RNA wurde mit Hilfe des Superscript 1st Strand cDNA Synthesis Kits nach Herstellerangaben in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Es wurde die maximale Menge an RNA eingesetzt. Als Primer dienten, wenn nicht anders beschrieben, Random Primer.

3.12 Auswahl sequenz-spezifischer Primer

Spezifische Primer wurden mit Primer Select, Lasergene ausgewählt. Die Annealing-Temperatur sollte zwischen 50°C und 60°C liegen. Die Sequenzen wurden so ausgewählt, dass die Primer möglichst keine Dimere bilden und sich möglichst wenig falten. Die Sonden wurden von Dr. Andreas Nitsche (ZBS1) ausgewählt. Die kommerziell hergestellten Primer und Sonden (Tib MolBiol) sind in Tab. 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2: Verwendete Primer und Sonden.

Name	Sequenz	Annealing-Temperatur
B3 F	5' CCAACAGCGTCACTCCTAATGAG	59°C
B3 R	5' GCTGCTCTGGATGATGATGCA	59°C
B3 TM	6-FAM-CCACGCACCCATCAGCATCATCC q	68°C
F23-K1 F	5' AACTGGAGGGAAGATGTGGAAGAG	59°C
F23-K1 R	5' ATCTAGCGACCTCCACCCTCACA	59°C
F23-K1TM	6-FAM-CCGTTCCAAGGACACTCCAGAACAGCC XT – PH	68°C
F23-K4 F	5' AGAATGCTTTGTCACTGG	59°C
F23-K4 R	5' AGCAGCAACTTATAAAACAAATC	59°C
F23-K4 TM	6-FAM- TTCTCCGCTAATAAAAA-MGB	68°C
F23-K19 F	5' GCGTATCTTGCCAGTGTGAGTT	59°C
F23-K19 R2	5' TTTCTTGTGTTCTGCTTCACCG	59°C
F23-K19 TM	F- CCTGTCGTATCTTTTT-NFQ	68°C
B3_C1outF	5' CACGCTCGTTGCCATCACTG	57°C
B3_C1outR	5' GGCTCCCGTTGTCGTTGTC	55°C
B3_C2outF	5' GGCCAGCGTTGAATCAGAC	55°C
B3_C2outR	5' CGTTAGATCTCTTCCTGTTTTCTC	54°C
B3_C2outR2	5' AACATTACAGCCTCCTTTCT	50°C
B3_C3outF	5' ATGAACTTGTAACGGAGGCGG	56°C
B3_C3outF2	5' ATGGGAAAGGTGAGTGGATGA	53°C
B3_C3outR	5' ATTGCATGGGAAAGGTGAGTGG	58°C
B3_C3outR2	5' ATGTAATGCCTCTTTTCTGCTC	55°C
B3_C4outF	5' TGGCATGTCACGCAAGGAG	55°C
B3_C4outR	5' GACAGCAACGCCAGCAAAGG	58°C
B3_C5outF	5' CAAGTGCTGGATGGAAGGAAT	53°C
B3_C5outR	5' CTGTAGGGATGCTCTTCGTCAAAT	56°C

Tab. 3.2: Fortsetzung:

Name	Sequenz	Annealing-Temperatur
B3_C8outF	5' TCCGGTGATGTTGAGGCTTGAT	58°C
B3_C8outR	5' TGTGGAGGTCGCTAGATGGTCA	57°C
B3_C12outF	5' GGC GGCTTATCAGAGTGGCTTGTG	56°C
B3_C12outF2	5' TGAAATGAACAGCGGGGGTGA	59°C
B3_C12outR3	5' CTATTGAGCTACCCTTCCGATTCC	59°C
B3_FU1F	5' TACAACATGATGGGAAAACGCGAAAA	50°C
F23-K24 F	5' TGACTTCTTTGGCGGTATGGATG	57°C
F23-K24 R	5' GTAAACAAGTAGCTATGACCCTGC	57°C
F23-K53 F	5' AGCCCCGATAAGAGATAGCAAAAC	57°C
F23-K53 R	5' CATATCTGACCCGTCCACAAA	57°C
F23-K114R	5' ACTACTCCTCATCATCAAAA	54°C
F23_1 out F	5' ATGTAATATGTGAGGGTGGAGGTC	53°C
F23_1 out R	5' GGTGTGAAGAGAATCCTGGTAGT	50°C
F23_4 out F	5' AATATTACGCTGGGTGGAGGTC	54°C
F23_7 out R	5' GCTTCTTTGTTAGTAGCATAGCCTAT	56°C
F23_7 out F	5' TGATAGTGGGCTGTGGAGGTC	54°C
F23_24 out R	5' ATGCCATCCTCTGTTGCTTTCTTA	56°C
F23_24 out F	5' TGTTCCAAGGATTGAAGAAGAGATC	57°C
F23_53 out R	5' CCCTTGTTTTGCTATCTCTTATCG	54°C

F = Forward, R = Reverse, TM = TaqMan

3.13 Konventionelle PCR

3.13.1 Konventionelle PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht eine selektive Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit Hilfe von spezifischen Primern und einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Alle PCRs wurden nach dem in Tab. 3.3 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tab.3.3: PCR-Protokoll und Cycler-Bedingungen.

Rox-Puffer (10x)	2,5 µl	Cycler-Bedingungen: 94°C 5 min 94°C 30 sec 50-60°C 30 sec 72°C 1 min 72°C 10 min } 40x	
dNTPs (2,5mM)	2 µl		
MgCl ₂ (50mM)	2 µl		
Forward Primer (10µM)	0,75 µl		
Reverse Primer (10 µM)	0,75 µl		
Platinum Taq-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl		
Template	2 µl		
Aqua bidest	ad 25 µl		

3.13.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten wurden je nach Größe der erwarteten Amplifikate 1-2 %ige Agarosegele eingesetzt. Bei der Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer durch Kochen geschmolzen, in eine Horizon 58 Gelelektrophorese-Kammer gegossen

und ein Kamm für die Bildung von Probestaschen eingesetzt. Beim Erkalten bildet sich eine feste, homogene Gelmatrix. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit glycerinhaltigem Ladepuffer versetzt. Für eine Größenbestimmung der aufgetrennten Fragmente wurde ein Molekulargewichtsmarker in einer benachbarten Spur aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte, je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente, zwischen 65 und 95 V für 30-90 min. Zur Darstellung der Nukleinsäuren unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm oder 300 nm wurden 10 µl Ethidiumbromid zugegeben.

Bei der Auftrennung von viraler RNA wurden nur RNase-freie Chemikalien verwendet und die Gelkammer wurde vor Gebrauch mit RNase Away ebenfalls RNase-frei gemacht. Der Lauf erfolgte bei 60 V für 90 min. Um eine Degradierung der RNA zu verhindern, wurde das Gel erst nach dem Lauf mit 20 µl Ethidiumbromid in 50 ml 1x TAE-Puffer für 30 min gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

3.14 Real-Time PCR (TaqMan™)

Die *Real-Time* PCR basiert auf der PCR und ermöglicht neben der Amplifikation noch eine spezifische Detektion und Quantifizierung über eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonde. Das Signal der Sonde wird während der PCR kontinuierlich gemessen, so dass die Menge des synthetisierten Amplikons in Echtzeit verfolgt werden kann (Heid *et al.*, 1996). Die *Real-Time* PCR wurde mit dem ABI Prism™ 7500, bzw. 7900 Sequence Detector durchgeführt. Das PCR-Protokoll ist in Tab. 3.4 dargestellt.

Tab.3.4: *Real-Time* PCR-Protokoll und PCR Programm.

Rox-Puffer (10x)	2,5 µl	Cycler-Bedingungen: 95°C 10 min 95°C 15 sec 60°C 30 sec } 45 x
dNTPs (2,5mM)	2 µl	
MgCl ₂ (50mM)	2 µl	
Forward Primer (10µM)	0,5 µl	
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl	
Sonde (10 µM)	0,25 µl	
Rox (100 µM/10 µM) ^a	0,25 µl	
Platinum Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1 µl	
Template	2 µl	
Aqua bidest	ad 25 µl	

^a Konzentration gerätabhängig, bei 7500er 10 µM, bei 7900er 100 µM

Für das Screenen der gepoolten Moskitokörper und der CPE verursachenden Pools aus der Zellkultur wurden bereits etablierte *Real-Time* PCR Systeme verwendet. Diese Proben wurden auf Dengue Virus Typ 1-4 (Nitsche *et al.*, in Vorbereitung), West-Nil Virus (Linke *et al.*, submitted), Gelbfieber Virus (Bae *et al.*, 2003) und mit einer generischen Flavivirus PCR

(Nitsche *et al.*, in Vorbereitung) getestet. Als interne Kontrolle auf Inhibitoren wurde eine in einen Vektor ligierte synthetische Sequenz, die als Standard diente, mit laufen gelassen (Nitsche *et al.*, in Vorbereitung). Der Zellkulturüberstand des Pools F24 wurde auf Coronaviren getestet (Nitsche *et al.*, in Vorbereitung).

3.15 Aufreinigung von DNA

3.15.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR-Purification Kit verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 50 µl Aqua bidest eluiert.

3.15.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die aufzureinigende Bande wurde mit einem Mehrweg-Skapell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und nach dem Protokoll des JETquick Kits aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 40 µl Aqua bidest.

3.16 Klonierung

Zur Herstellung der Standardreihen für die *Real-Time* PCR und zur Charakterisierung der durch *Random Priming* amplifizierten Sequenzen wurden die PCR-Amplifikate kloniert.

Bei den zu klonierenden PCR-Produkten, die aus den Agarosegelen gewonnen wurden, erfolgte zuerst eine „Auffrischungs“-PCR bei der die Enden Oligo-A-Überhänge angefügt wurden (s. Tab. 3.5). Anschließend erfolgte die Ligation in den pCR2.1-Vektor des TOPO TA Cloning Kits.

Tab.3.5: Protokoll für „Auffrischungs“-PCR.

Mix:	10xNH ₄ -PCR-Puffer	2,5 µl
	dNTPs (2,5 mM)	2 µl
	MgCl ₂ (50mM)	1,5 µl
	<i>Taq</i> -Polymerase	0,25 µl
	Aqua bidest	ad 25 µl

10 µl PCR-Produkt + 4 µl Mix
10 Min bei 70°C

Zur Ligation der PCR-Produkte wurde der Ansatz 20 min bei RT inkubiert (Tab. 3.6). Der halbe Ligationsansatz wurde anschließend auf 50 µl Z-kompetente *Escherichia coli* XL-1 blue

gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Als Transformationskontrolle diente 1 ng des Plasmids pEMBL, mit dem ebenfalls 50 µl der Z-kompetenten *Escherichia coli* XL-1 blue transformiert wurden. Diese Ansätze wurden auf LB-Amp (10 µg/ml)-Platten gegeben, auf denen vorher 24 µl X-Gal (200 mg/ml) und 4 µl IPTG (0,1 M) ausgestrichen wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Tab.3.6: Ligationsansatz.

PCR-Produkt	4 µl
Vektor	0,5 µl
Salt Solution	1 µl

Am folgenden Tag erfolgte die Bewertung der Kolonien mittels Blau/Weiß-Selektion. Der verwendete Vektor kodiert für eine lacZ-Untereinheit (lacZ α), die bei den Wirtsstämmen jedoch defekt ist und durch das Plasmid zu einer funktionellen β -Galaktosidase komplementiert wird. Innerhalb dieser lacZ-Untereinheit befindet sich eine multiple Klonierungsstelle, in die das PCR-Produkt ligiert wird. Wird nun eine DNA-Sequenz in die vorgesehene Position ligiert, ist damit ein Funktionsausfall dieses Gens verbunden. Dies hat zur Folge, dass das Enzym β -Galaktosidase nicht gebildet werden kann und somit x-Gal nicht in einen blauen Farbstoff umgewandelt werden kann. Diese Kolonien bleiben weiß. Entsprechend wurden die weißen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und direkt in eine PCR (Kolonien-PCR) eingesetzt (Tab. 3.7). Die vektorspezifischen M13 Primer sind im TOPO TA Cloning Kit enthalten. Zur Überprüfung der erhaltenen Inserts wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt und ausgewertet.

Tab.3.7: Kolonien-PCR Ansatz.

10x-NH ₄ -PCR-Puffer	5 µl	Cycler-Bedingungen: 94°C 5 min 94°C 30 sec 57°C 30 sec 72°C 1 min 72°C 10 min } 40x	
dNTPs (2,5mM)	4 µl		
MgCl ₂ (50mM)	2 µl		
M13 forward (10µM)	1 µl		
M13 reverse (10 µM)	1 µl		
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,25 µl		
Aqua bidest	ad 50 µl		

3.17 Plasmid-Präparation

Die Isolation von Plasmiden erfolgte aus 3 ml-Kulturen. Dazu wurden nach den beschriebenen Kriterien ausgewählte Kolonien in 3 ml LB-Medium, versetzt mit Ampicilin (100 µg/ml), inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Zur Plasmidpräparation wurde

das NucleoSpin® Plasmid Kit verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der DNA bei 280 nm ($1 \text{ OD} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$) im Photometer.

3.18 Berechnung der Kopienzahl

Nach folgender Formel wurde die Kopienzahl berechnet:

1 bp dsDNA entsprechen 660 g/mol

1 mol = $6,023 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹ (Avogadro Konstante)

Plasmidgröße [bp] = Vektorgröße [bp] + Insertgröße [bp]

Plasmidgröße [bp] * 660 g/mol = Molarität [g/mol]

Molarität [g/mol] / $6,023 \cdot 10^{23}$ = Gewicht [g/Plasmid, bzw. ng/Plasmid]

DNA Konzentration [ng/ μl] / Gewicht [ng/Plasmid] = Anzahl Plasmide [Plasmide/ μl]

3.19 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse nach Sanger basiert auf der Kettenabbruchmethode und wird genutzt, um die Basenabfolge von DNA-Abschnitten zu analysieren (Sanger *et al.* 1977). Für die Sequenzierungs-Reaktion wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet (Tab. 3.8). Für Sequenzen, die eine Länge von 500 bp überschritten, wurde der ½ Ansatz verwendet. Es wurden in getrennten Ansätzen die Primer verwendet, die zur Amplifikation der DNA dienten. Die Auftrennung erfolgte mit dem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer. Die Sequenzdaten wurden mit der SeqMan und Meg-Align-Software (Fa. Lasergene) ausgewertet und in der öffentlichen Datenbank (NCBI) nach Homologien gesucht.

Tab. 3.8: Sequenzierungsansatz.

	¼ Ansatz	½ Ansatz	Cycler-Bedingungen:	
Primer	0,5 μl	0,5 μl	96°C 2 min	} 25x
Big Dye	1 μl	2 μl	96°C 10 sec	
Puffer	1,5 μl	1 μl	50-60°C 5 sec	
Aqua bidest	ad 10 μl	ad 10 μl	60°C 4 min	
DNA	s.u.	s.u.		
PCR-Produkte: 100-200 bp	1-3 ng			
200-500 bp	3-10 ng			
500-1000 bp	10-20 ng			

3.20 Versuche zur Charakterisierung von Virusgenomen durch *Random Priming*

Um Sequenzinformationen von unbekannten Viren zu erhalten, wurde die von Stang *et al.* (2005) beschriebene Methode verwendet, bei der eine cDNA-Synthese mit Hilfe von Random Primern, an die eine Ankersequenz gebunden ist (Random-K Primer), erfolgt. Mit Hilfe dieser Ankersequenz (Primer K) erfolgt eine spezifische Amplifikation der cDNA in der PCR (Tab. 3.9), welche dann kloniert und sequenziert werden kann.

Tab. 3.9: cDNA Doppelstrang Synthese.

<u>Erst-Strang-Synthese</u>		
1.	RNA	2 µg
	Random-K Primer (10 µM)	2 µl
	Aqua bidest	ad 15 µl
2.	70°C für 10 min	
3.	First Strand 5x Puffer	5 µl
	RNasin Ribonuclease Inhibitor	1 µl
4.	37°C für 5 min	
5.	Sodium Pyrophosphate	2,5 µl
	AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl
	Aqua bidest (ad 25 µl)	0,7 µl
6.	37°C für 60 min; 4°C ∞	
<u>Zweit-Strang-Synthese</u>		
7.	Erst-Strang-Synthese-Probe	20 µl
	Second Strand 2,5x Buffer	40 µl
	Acetylated BSA	5 µl
	DNA Polymerase I	0,5 µl
	RNase H (0,8 U)	0,4 µl
	Aqua bidest (ad 100 µl)	34,1 µl
8.	Vorsichtig mixen durch schnipsen des Reaktionsgefäßes	
9.	Bei 14°C für 3 h inkubieren	
10.	70°C für 10 min	
11.	kurze Zentrifugation der Probe; auf Eis stellen	
12.	T4 DNA Polymerase	0,25 µl
13.	37°C für 10 min	
14.	200 mM EDTA	10 µl
	stoppt die Reaktion; Lagerung bei -20°C	

Von den zu untersuchenden Viren wurden Viruspellets wie unter 3.5 beschrieben hergestellt und RNA mit dem Viral RNA Kit isoliert (3.10.2). Anschließend wurde eine cDNA-Doppelstrangsynthese mit dem Universal RiboClone® cDNA Synthesis System Kit mit Random-K Primern, die eine spezifische Ankersequenz besitzen, durchgeführt (Tab. 3.9). Die cDNA wurde über Nacht mit den Random-K Primern inkubiert, um ein Anlagern der Primer an die cDNA zu gewährleisten. Am folgenden Morgen wurden die Ankerüberhänge der Random-K Primer durch die Zugabe von T4-Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt, so dass diese auch als Doppelstrang vorlagen (Tab. 3.10). Die Proben wurden dann zur

Amplifikation in eine konventionelle PCR mit der Ankersequenz der Random-K Primer als Primer (Primer K) eingesetzt (Tab. 3.11). Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und in den TOPO pCR2.1 Vektor kloniert und wie beschrieben analysiert (3.12.1, 3.15, 3.17).

Tab. 3.10: Primer Annealing und Primer-Extension.

Annealing-Puffer:	Random-K Primer (10 pmol)	10 µl
	Tris HCl (1,5 M)	0,6 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	4 µl
	Dithiothreitol (0,1 M)	2 µl
	ATP (10 mM)	2 µl
18,6 µl Annealing-Puffer + 1,4 µl cDNA der 2 nd Strand Synthese über Nacht bei 22°C inkubieren; Ansatz 15 min bei 65°C erhitzen;		
Extension-Puffer:	NaCl (2M)	2,4 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	4,8 µl
	dNTP (25 mM)	0,32 µl
	Aqua bidest	12.48 µl
Zugabe von	0,125 µl T4 DNA-Polymerase und 5 µl Extension Puffer 12°C 20 min 75°C 10 min (Inaktivierung der T4 Polymerase)	

Tab. 3.11: PCR-Protokoll zur Amplifikation unbekannter Sequenzen.

Primer K	1,5 µl	Cycler-Bedingungen:
dNTP	4 µl	95°C 5 min
MgCl ₂	2 µl	95°C 30 sec
10xNH ₄ -PCR-Puffer	5 µl	55°C 30' sec
Taq Polymerase	0,25 µl	72°C 1 min
Aqua bidest	ad 50 µl	72°C 10 min
10 µl Mix + Template	5 µl	

3.21 Differenzierung von DNA- und RNA-Viren und Bestimmung der Genomorientierung von RNA Viren

Um bestimmen zu können, ob die Nukleinsäure des zu untersuchenden Virus aus DNA oder RNA besteht, bzw. ob das RNA-Genom einzel- oder doppelsträngig vorliegt, wurden 300 µl virushaltiger Zellkulturüberstand mit 3 µl RNase A versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein DNase-Verdau nach Herstellerangaben (Ambion) mit einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C durchgeführt. Dies sollte gewährleisten, dass Nukleinsäuren die bei einer Zelllyse freigesetzt werden und an Viruspartikel adsorbieren, vor dem Aufschluss der Viruspartikel verdaut werden. Anschließend erfolgte eine Nukleinsäureextraktion mit Tri Reagent®. Zur cDNA-Synthese wurden vier verschiedene

Ansätze durchgeführt, (a) Synthese mit Random Primern, (b) Synthese mit Random Primern ohne Reverse Transkriptase, (c) Synthese mit virusspezifischem Forward Primer, (d) Synthese mit virusspezifischem Reverse Primer. Durch diese Strategie kann zwischen DNA- und RNA-Viren unterschieden und bei RNA-Viren kann die Orientierung des Genoms ermittelt werden. Die vier Ansätze wurden mit den virusspezifischen Primern in die PCR eingesetzt und die Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt.

3.22 Phylogenetische Analyse

Zur phylogenetischen Analyse wurden alle für einen Stammbaum relevanten Sequenzen in Bio Edit eingeladen, editiert und ein Alignment erstellt. Der Stammbaum wurde mit dem PHYLIP 3.572 Package erstellt. Als phylogenetische Methode wurde das distanzbasierte *Neighbour-Joining*-Verfahren gewählt (Thompson *et al.*, 1994). Dabei wird die Distanz aller Positionen im Alignment jeweils zwischen zwei Sequenzen (paarweise) verglichen. Aus der daraus ermittelten Matrix werden die genetischen Distanzen für die Konstruktion eines Stammbaums errechnet. Um die Signifikanz der Verzweigungspunkte im Stammbaum und damit die Stabilität der Baumstruktur zu überprüfen, wurde eine *bootstrap*-Analyse durchgeführt. Dabei werden die Positionen eines Alignments in unterschiedlicher Abfolge zusammengestellt, wobei manche Nukleotidpositionen nicht berücksichtigt werden, andere hingegen aber mehrfach (*bootstrap*). Daraus entstehen unterschiedliche Bäume, aus denen ein Konsensbaum erzeugt wird. Die Bootstrap-Analyse gibt ein Maß für die statistische Wahrscheinlichkeit der einzelnen Verzweigungspunkte an. Die *bootstrap*-Werte wurden aus einem Datenset mit 1000 Wiederholungen bestimmt.

3.23 Immunfluoreszenztest

3.23.1 Herstellung spezifischer Antikörper

Um eine ausreichend große Menge an Virusmaterial zur Immunisierung zu erhalten, wurden 24 175 cm²-Flaschen mit C6/36 Zellen mit dem jeweiligen Virus infiziert und nach Ausbildung eines deutlichen CPE's der Überstand in der Ultrazentrifuge pelletiert (3.5). Das Pellet wurde in 1,5 ml PBS "ohne" aufgenommen und ein Aliquot zur Titration verwendet. Das restliche Pellet wurde mit β -Propiolacton inaktiviert (Refaie *et al.*, 2004). 90 μ l Tris-HCl (pH 8,5) wurden mit 10 μ l β -Propiolacton versetzt, 3,5 ml PBS „ohne“ und das in 1,5 ml PBS „ohne“ gelöste Viruspellet zugegeben und der Ansatz gevortext. Der pH-Wert sollte zwischen 7,4 und 8,4 liegen. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und

anschließend zur vollständigen Zersetzung des β -Propiolactons 4 h bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot der inaktivierten Virussuspension wurde austitriert, um die Virusinaktivierung zu überprüfen. Der Rest der inaktivierten Virussuspension wurde 2 h bei 35.000 g bei 4°C in der Ultrazentrifuge (Rotor SW40) pelletiert und das Pellet in 1,5 ml PBS „ohne“ aufgenommen. Es wurden drei Aliquots a 500 μ l hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Am Tag vor der Immunisierung wurde das Kaninchen geblutet, um Präserum zu gewinnen. Zur Immunisierung wurden 500 μ l inaktiviertes Virus mit 500 μ l Freud'sches Adjuvans complete versetzt und der Ansatz für 15 min gevortext. Anschließend erfolgte eine Homogenisation durch Ultraschallbehandlung in einem Branson Sonifier 450 (2x2 min, Output Control 50, Duty Cycle 5). Die Behandlung wurde so lange wiederholt bis die Suspension viskos war. Die Suspension wurde in eine Spritze aufgezogen und das Kaninchen subcutan immunisiert. Nach 14 Tagen erfolgte eine 1. Boosterung mit Antigen in Freud'schem Adjuvans incomplete wie oben beschrieben. Nach 28 Tagen wurde eine 2. Boosterung durchgeführt. Das Tier wurde jeweils einen Tag vor der Boosterung und 14 Tage nach der letzten Boosterung geblutet. Nach 42 Tagen wurde der Antikörpertiter im Immunfluoreszenztest gemessen und bei ausreichend hoher Konzentration, wurde das Tier noch einmal geblutet und 14 Tage später ausbluten gelassen.

Es wurde Serum gegen die Virusisolate aus Pool B3, B14, D24 und F24 hergestellt (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Bezeichnung der hergestellten Antiseren und Dosis mit der immunisiert wurde.

Antiserum	Isolat/Pool	Immunisierungsdosis
α -B3	B3	4×10^7 TCID ₅₀ /ml
α -B14	B14	1×10^{12} TCID ₅₀ /ml
α -D24	D24	2×10^7 TCID ₅₀ /ml
α -F24	F24	1×10^{10} TCID ₅₀ /ml

3.23.2 Immunfluoreszenztest (IFT)

Der Immunfluoreszenztest (IFT) erfolgte auf infizierten Zellen in 96-Well-Platten. Die infizierten Zellen wurden mit 200 μ l 4 % Formaldehyd in PBS „ohne“ gepuffert fixiert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Das Formalin wurde von den Zellen genommen und diese mit 200 μ l PBS „ohne“ gewaschen und 70 μ l/Kavität 0,2 % Triton-X 100 in PBS zugegeben. Die Zellen wurden 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 200 μ l PBS „ohne“ gewaschen. Nun wurden pro Kavität 50 μ l des ersten Antikörpers zugegeben. Der Antikörper wurde in in PBS + 2 % BSA, 0,2 % Na-Acid, verdünnt. Es wurden folgende

Verdünnungen eingesetzt 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:5000 und 1:8000 für B3 und B14 und 1:100, 1:1000, 1:5000 und 1:10000 für D24 und F24. Die Zellen wurden mit dem Antikörper eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend drei Mal mit 200 µl PBS „ohne“ pro Kavität gewaschen, wobei der letzte Schritt 10 min inkubiert wurde. Der zweite Antikörper (anti-Rabbit IgG Cy3 1:400 in PBS „ohne“) wurde zugegeben und einen Stunde bei 37°C binden gelassen. Die Zellen wurden drei Mal mit 200 µl PBS „ohne“ pro Kavität gewaschen, wobei der letzte Schritt 10 min inkubiert wurde. Die Zellkernfärbung wurde mit DAPI oder Cytos Green durchgeführt. Die Färbesubstanz wurde für 10 min auf den Zellen belassen, abgenommen und 200 µl PBS „ohne“ auf die Zellen gegeben. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop (FITC Filter 10, 450-490 nm; DAPI Filter 01, 360-370 nm).

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung der Proben

In der Zeit von Anfang Februar bis Ende Mai 2004 wurden im Taï Nationalpark und umliegender Gebiete mit zwei verschiedenen Falltypen (CDC *Light Traps*, CDC *Gravid Traps*) insgesamt 7067 adulte Mücken gefangen. Die Sammelpunkte befanden sich entlang einer gradlinigen Transsekte, die ausgehend von dem Nordcamp im Primärwald, durch den Primär- und Sekundärwald, Kaffee- und Kakao-Plantagen, Reis- und Mais-Felder bis zum Dorf Gouléako gelegt wurde (Abb. 3.3). Zusätzlich wurden Proben abseits der Transsekte an drei weiteren Camps (Assistentencamp des Nordcamps, Camp Noë, Station), an zwei weiteren Stellen im Primärwald und in der Kleinstadt Taï genommen. Da durch die Stratifikation des Regenwaldes die Artenzusammensetzung der Tierpopulation in verschiedenen Höhen stark variiert, wurden die *Light Traps* im Primärwald in der Höhe von 1 m, 8 m, 16 m, 24 m und 32 m und im Sekundärwald in der Höhe von 1 m, 8 m und 16 m aufgehängt. An den Fallen wurde ein Messgerät zur Ermittlung von Temperatur und Luftfeuchtigkeit angebracht, welches die maximalen und minimalen Werte aufzeichnete. Von allen Maximal- und Minimalwerten einer Zone wurde der Mittelwert gebildet (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Darstellung der Mittelwerte der maximalen und minimalen Temperatur- und Luftfeuchtigkeitswerte.

	A	B	C	D	E	F
Temp. Max [°C]*	27,2	25,8	26,3	26,5	30,3	29,1
Temp. Min [°C]*	23,1	22,1	23	22,8	22,7	23,5
Durchschnitt [°C]	25,2	24	24,7	24,7	26,5	26,3
Hum. Max [%]*	94,1	98	97,6	96,4	95,1	92
Hum. Min [%]*	85,2	83	80,9	79,8	69,4	82,2
Durchschnitt [%]	90	90,5	89,3	88,1	82,3	87,1

* Mittelwerte; A = Camp, B = Primärwald, C = Sekundärwald, D = Kaffee- und Kakao-Plantagen, E = Reis- und Mais-Felder, F = Dorf; Temp.= Temperatur; Hum.= Luftfeuchtigkeit (*humidity*)

Es wurden 115 Moskitoarten gefangen, die zu sieben verschiedenen Genera gehören. 1128 (16,0 %) Moskitos konnten nur bis zum Genus oder Subgenus identifiziert werden. Bei 671 (9,5 %) weiblichen und 1179 (16,7 %) männlichen Moskitos wurde nur das Geschlecht identifiziert und die Moskitos nicht weiter bestimmt, da es aufgrund der vorliegenden Bestimmungsliteratur nicht möglich war, alle Moskitos bis zur Art zu bestimmen. Moskitos, bei denen die Art nicht identifiziert werden konnte, wurden mit x1 bis x67 durchnummeriert. Wenn es möglich war die Moskitos bis zum Genus oder Subgenus zu bestimmen, folgen diese Angaben in Klammern (Tab. 4.2). Die Gesamtmenge der einzelnen

Arten und ihr prozentualer Anteil an der Menge aller in der jeweiligen Zone gefangenen Moskitos, sowie die Anzahl an Moskitos der verschiedenen Arten, die pro Fangeneinheit (FE) gefangen wurden, sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Im Dorf war die Artenvarianz (Anteil der gefangenen Arten pro Zone an der Gesamtmenge verschiedener Arten) mit 40,9 % am höchsten und im Primärwald mit 20 % am geringsten.

Die Anzahl gefangener Moskitos bezogen auf die Anzahl an Fangeneinheiten (FE) in den sechs verschiedenen Zonen und in den unterschiedlichen Höhen variierte stark (Abb. 4.1). Die Werte in 0 m Höhe stammen von den *Gravid Traps*, die direkt auf dem Boden installiert und tagsüber betrieben wurden.

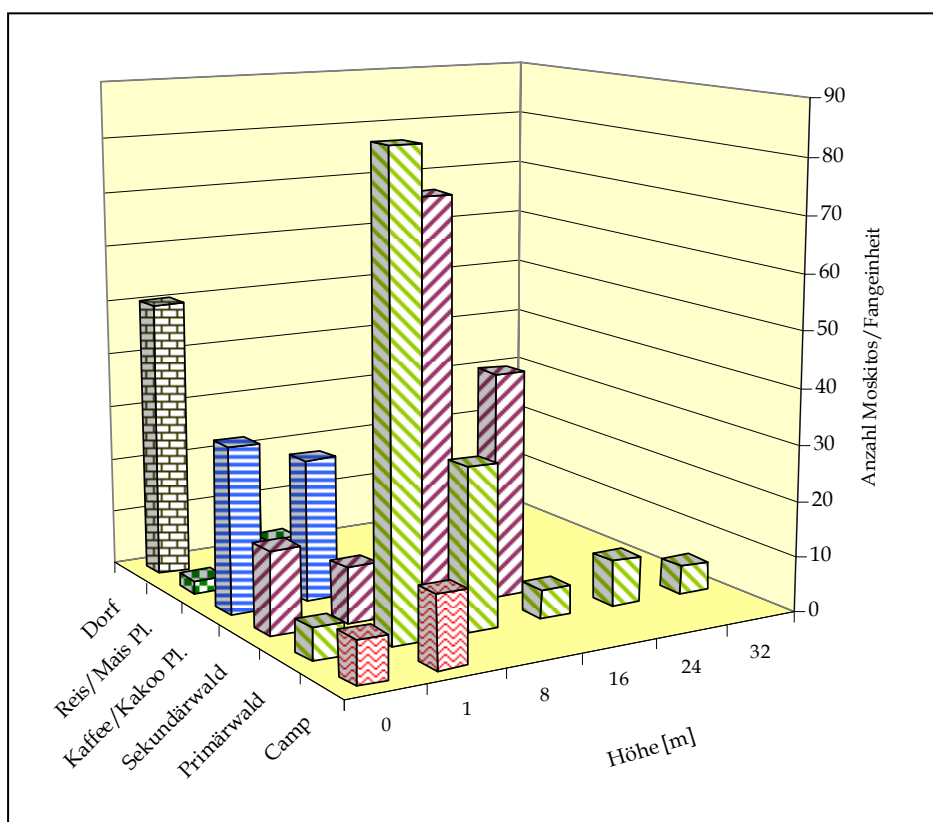


Abb. 4.1: Anzahl gefangener Moskitos in den einzelnen Zonen und verschiedenen Höhen bezogen auf die Fangeneinheiten. Die Moskitos in 0 m Höhe wurden tagsüber mit *Gravid Traps* gefangen. Die der anderen Höhen nachts mit *Light Traps*.

[illegible]

Tab. 4.2: Fortsetzung.

	Gesamt	Gesamt A	M/FE	Gesamt B	M/FE	Gesamt C	M/FE	Gesamt D	M/FE	Gesamt E	M/FE	Gesamt F	M/FE
An. welcomei	1											1 (0,1)	0,02
Coquillettia metallica	2	1 (0,09)	0,01	1 (0,05)	0,01								
Culiseta spp.	1	1 (0,09)	0,01										
Culicinae spp.	39											39 (3,74)	0,93
Culex spp.	373	170 (15,12)	2,50	5 (0,25)	0,07	104 (6,44)	3,15	36 (3,44)	1,20	11 (5,16)	0,37	47 (4,51)	1,12
Culex Culicomyia spp.	30							30 (2,87)	1,00				
Culex Culex spp.	11							10 (0,96)	0,33			1 (0,1)	0,02
Culex Eumelanomyia spp.	125			19 (0,94)	0,27	32 (1,98)	0,97	29 (2,77)	0,97	1 (0,47)	0,03	44 (4,22)	1,05
Cx annulioris	274							230 (21,99)	7,67	31 (14,55)	1,03	13 (1,25)	0,31
Cx antennatus	54	51 (4,54)	0,75									3 (0,29)	0,07
Cx argenteopunctatus	1	1 (0,09)	0,01										
Cx bitaeniorhynchus	1							1 (0,1)	0,03				
Cx cinerellus	13												
Cx cinereus	2			13 (0,64)	0,19								
Cx decens	518	2 (0,18)	0,03	14 (0,69)	0,20	282 (17,47)	8,55	210 (20,08)	7,00	6 (2,82)	0,20	2 (0,19)	0,05
Cx horridus	86											4 (0,38)	0,10
Cx nebulosus	130	16 (1,42)	0,24	3 (0,15)	0,04	62 (3,84)	1,88	78 (7,46)	2,60	3 (1,41)	0,10	5 (0,48)	0,12
Cx pipiens	34	9 (0,8)	0,13					20 (1,91)	0,67	6 (2,82)	0,20	23 (2,21)	0,55
Cx quinquefasciatus	85	4 (0,36)	0,06					2 (0,19)	0,07	17 (7,98)	0,57	6 (0,58)	0,14
Cx rubinotus	4							2 (0,19)	0,07			79 (7,57)	1,88
Cx simpliforceps	2			2 (0,1)	0,03			3 (0,29)	0,10			1 (0,1)	0,02
Cx telesilla	12	12 (1,07)	0,18										
Cx thalassius	1											1 (0,1)	0,02
Cx wigglesworthi	1			1 (0,05)	0,01								
Cx zombaensis	1	1 (0,09)	0,01										
Eretmapodites subsimplicipes	1			1 (0,05)	0,01								
Harpagomyia spp.	10											10 (0,96)	0,24
Mansonia africana	1											1 (0,1)	0,02
Uranotaenia spp.	152	151 (13,43)	2,22			1 (0,06)	0,03						
Ur. ornata	424			424 (20,92)	6,06								
Ur. Pseudoficalbia spp.	73			66 (3,26)	0,94			2 (0,19)	0,07	2 (0,94)	0,07	3 (0,29)	0,07
Ur. Uranotaenia spp.	57	12 (1,07)	0,18	36 (1,78)	0,51			4 (0,38)	0,13	3 (1,41)	0,10	2 (0,19)	0,05

Tab. 4.2: Fortsetzung.

	Gesamt	Gesamt A	M/FE	Gesamt B	M/FE	Gesamt C	M/FE	Gesamt D	M/FE	Gesamt E	M/FE	Gesamt F	M/FE
An. welcomei	1											1 (0,1)	0,02
Coquillettia metallica	2	1 (0,09)	0,01	1 (0,05)	0,01								
Culiseta spp.	1	1 (0,09)	0,01										
Culicinae spp.	39											39 (3,74)	0,93
Culex spp.	373	170 (15,12)	2,50	5 (0,25)	0,07	104 (6,44)	3,15	36 (3,44)	1,20	11 (5,16)	0,37	47 (4,51)	1,12
Culex Culicomyia spp.	30							30 (2,87)	1,00				
Culex Culex spp.	11							10 (0,96)	0,33			1 (0,1)	0,02
Culex Eumelanomyia spp.	125			19 (0,94)	0,27	32 (1,98)	0,97	29 (2,77)	0,97	1 (0,47)	0,03	44 (4,22)	1,05
Cx annulioris	274							230 (21,99)	7,67	31 (14,55)	1,03	13 (1,25)	0,31
Cx antennatus	54	51 (4,54)	0,75									3 (0,29)	0,07
Cx argenteopunctatus	1	1 (0,09)	0,01										
Cx bitaeniorhynchus	1							1 (0,1)	0,03				
Cx cinerellus	13												
Cx cinereus	2			13 (0,64)	0,19								
Cx decens	518	2 (0,18)	0,03	14 (0,69)	0,20	282 (17,47)	8,55	210 (20,08)	7,00	6 (2,82)	0,20	2 (0,19)	0,05
Cx horridus	86											4 (0,38)	0,10
Cx nebulosus	130	16 (1,42)	0,24	3 (0,15)	0,04	62 (3,84)	1,88	78 (7,46)	2,60	3 (1,41)	0,10	5 (0,48)	0,12
Cx pipiens	34	9 (0,8)	0,13					20 (1,91)	0,67	6 (2,82)	0,20	23 (2,21)	0,55
Cx quinquefasciatus	85	4 (0,36)	0,06					2 (0,19)	0,07	17 (7,98)	0,57	6 (0,58)	0,14
Cx rubinotus	4							2 (0,19)	0,07			79 (7,57)	1,88
Cx simpliforceps	2			2 (0,1)	0,03			3 (0,29)	0,10			1 (0,1)	0,02
Cx telesilla	12	12 (1,07)	0,18										
Cx thalassius	1											1 (0,1)	0,02
Cx wigglesworthi	1			1 (0,05)	0,01								
Cx zombaensis	1	1 (0,09)	0,01										
Eretmapodites subsimplicipes	1			1 (0,05)	0,01								
Harpagomyia spp.	10											10 (0,96)	0,24
Mansonia africana	1											1 (0,1)	0,02
Uranotaenia spp.	152	151 (13,43)	2,22			1 (0,06)	0,03						
Ur. ornata	424			424 (20,92)	6,06								
Ur. Pseudoficalbia spp.	73			66 (3,26)	0,94			2 (0,19)	0,07	2 (0,94)	0,07	3 (0,29)	0,07
Ur. Uranotaenia spp.	57	12 (1,07)	0,18	36 (1,78)	0,51			4 (0,38)	0,13	3 (1,41)	0,10	2 (0,19)	0,05

Tab. 4.2: Fortsetzung.

	Gesamt	Gesamt A	M/FE	Gesamt B	M/FE	Gesamt C	M/FE	Gesamt D	M/FE	Gesamt E	M/FE	Gesamt F	M/FE
Ur. alboabdominalis	10			10 (0,49)	0,14								
Ur. balfouri	45			45 (2,22)	0,64								
Ur. chorleyi	93			55 (2,71)	0,79	9 (0,56)	0,27	5 (0,48)	0,17	16 (7,51)	0,53	8 (0,77)	0,19
Ur. mashaensis	631	1 (0,09)	0,01	536 (26,44)	7,66	35 (2,17)	1,06	21 (2,01)	0,70	19 (8,92)	0,63	19 (1,82)	0,45
Toxorhynchitinae spp.	6	6 (0,53)	0,09										
x1 (Cx antennatus spp.)	1	1 (0,09)	0,01										
x2 (Cx decens spp.)	87					87 (5,39)	2,64						
x3 (Cx decebs spp.)	30					30 (1,86)	0,91						
x4 (Cx nebulosus spp.)	402					13 (0,81)	0,39	69 (6,6)	2,30	28 (13,15)	0,93	292 (28)	6,95
x5 (Cx nebulosus spp.)	9							2 (0,19)	0,07			7 (0,67)	0,17
x6 (Cx nebulosus spp.)	16											16 (1,53)	0,38
x7 (Cx nebulosus spp.)	6									6 (2,82)	0,20		
x8 (Cx nebulosus spp.)	40						1,21						
x9 (Cx nebulosus spp.)	7	7 (0,62)	0,10										
x10 (Cx Eum spp.)	171	171 (15,21)	2,51										
x11 (Cx spp.)	11	11 (0,98)	0,16										
x12 (Cx spp.)	1	1 (0,09)	0,01										
x13 (Ur Pseudoficalbia spp.)	2			2 (0,1)	0,03								
x14 (Ur Pseudoficalbia spp.)	2			2 (0,1)	0,03								
x15 (Ur Pseudoficalbia spp.)	1			1 (0,05)	0,01								
x16 (Cx spp.)	11	5 (0,44)	0,07	6 (0,3)	0,09							6 (0,58)	0,14
x17 (Cx spp.)	7	1 (0,09)	0,01										
x18 (Cx spp.)	1	1 (0,09)	0,01										
x19 (Cx spp.)	4	2 (0,18)	0,03									2 (0,19)	0,05
x20 (Cx spp.)	1											1 (0,1)	0,02
x21 (Cx spp.)	1											1 (0,1)	0,02
x22 (Cx spp.)	1											1 (0,1)	0,02
x23 (Cx nebulosus spp.)	6											1 (0,1)	0,02
x24	1			1 (0,05)	0,01								
x25	80			54 (2,66)	0,77	26 (1,61)	0,79						
x26	8			8 (0,39)	0,11								
x27 (Cx Eum spp.)	50			16 (0,79)	0,23	34 (2,11)	1,03						

Tab. 4.2: Fortsetzung.

	Gesamt	Gesamt A	M/FE	Gesamt B	M/FE	Gesamt C	M/FE	Gesamt D	M/FE	Gesamt E	M/FE	Gesamt F	M/FE
x28	2					2 (0,12)	0,06						
x29	7					7 (0,43)	0,21						
x30	11					11 (0,68)	0,33						
x31	36					36 (2,23)	1,09						
x32	2					2 (0,12)	0,06						
x33	2					2 (0,12)	0,06						
x34 (An spp.)	31					31 (1,92)	0,94						
x35 (Cx cinerellus spp.)	20					20 (1,24)	0,61						
x36	13					13 (0,81)	0,39						
x37	1					1 (0,06)	0,03						
x38 (Cx Eum. spp.)	1					1 (0,06)	0,03						
x39	3					3 (0,19)	0,09						
x40	28					11 (0,68)	0,33	15 (1,43)	0,50	2 (0,94)	0,07		
x41	1					1 (0,06)	0,03						
x42	3					3 (0,19)	0,09						
x43 (Cx Culic. spp.)	3					3 (0,19)	0,09						
x44 (Cx Eum. spp.)	160					52 (3,22)	1,58	108 (10,33)	3,60				
x45 (Cx Culic. spp.)	1					1 (0,06)	0,03						
x46 (Ae Levua)	1					1 (0,06)	0,03						
x47	1					1 (0,06)	0,03						
x48 (Cx Cx spp.)	2					2 (0,12)	0,06						
x49 (Cx Eum. spp.)	1					1 (0,06)	0,03						
x50 (Cx Culic. spp.)	9							7 (0,67)	0,23	2 (0,94)	0,07		
x51 (Ae harrisoni spp.)	3							2 (0,19)	0,07			1 (0,1)	0,02
x52 (Cx Eum. spp.)	5							2 (0,19)	0,07	2 (0,94)	0,07	1 (0,1)	0,02
x53 (Cx Eum. spp.)	2							2 (0,19)	0,07				
x54	1							1 (0,1)	0,03				
x55 (Cx Eum. spp.)	51							38 (3,63)	1,27	12 (5,63)	0,40	1 (0,1)	0,02
x56 (Cx Eum. spp.)	5									5 (2,35)	0,17		
x57 (Cx Eum. spp.)	6							6 (0,57)	0,20				
x58 (Ur. spp.)	2									2 (0,94)	0,07		
x59 (Cx Cx spp.)	3									3 (1,41)	0,10		

Tab. 4.2: Fortsetzung.

	Gesamt	Gesamt A	M/FE	Gesamt B	M/FE	Gesamt C	M/FE	Gesamt D	M/FE	Gesamt E	M/FE	Gesamt F	M/FE
x60	1									1 (0,47)	0,03		
x61	1									1 (0,47)	0,03		
x62 (Cx Eum. spp.)	1									1 (0,47)	0,03		
x63	2												
x64	5												
x65 (Cx cinerellus spp.)	16											2 (0,19)	0,05
x66 (Cx Eum. spp.)	1											5 (0,48)	0,12
x67 (Cx decens spp.)	7											16 (1,53)	0,38
n.b. Weibchen	671	52 (4,63)	0,76	291 (14,36)	4,16	240 (14,87)	7,27	32 (3,06)	1,07	12 (5,63)	0,40	44 (4,22)	1,05
n.b. Männchen	1179	396 (35,23)	5,82	391 (19,29)	5,59	302 (18,71)	9,15	50 (4,78)	1,67	5 (2,35)	0,17	35 (3,36)	0,83
Gesamt	7067	1124 (100)		2027 (100)		1614 (100)		1046 (100)		213 (100)		1043 (100)	

Moskito, die nicht identifiziert werden konnten, sind mit x1 bis x67 durchnummeriert. Angaben über Genus und Subgenus sind in Klammern gemacht. Für jeden Fangort ist die Anzahl der gefangenen Moskito, in Klammern der Anteil an der Gesamtanzahl der gefangenen Moskito an dem Fangort, angegeben. A= Camps, B= Primärwald, C= Sekundärwald, D= Kaffee- und Kakao-Plantagen, E= Reis- und Mais-Felder, F= Dorf Gouléako und Kleinstadt Tai. M/FE= Moskito/Fangeneinheit, n.b.= nicht bestimmt, Ae= Aedes, An= Anopheles, Cx= Culex, Ur= Uranotaenia, Culic= Culicidae, Eum= Eumelanomyia, spp. = Spezies

Die größten Unterschiede waren im Primär- und im Sekundärwald zu beobachten. Im Primärwald war die Anzahl gefangener Moskitos in 16 m und in 24 m Höhe mehr als drei Mal so hoch wie direkt über dem Waldboden, in 1 m Höhe sowie in 32 m Höhe. Im Sekundärwald wurden die meisten Moskitos in 8 m Höhe gefangen. In 16 m Höhe war die Anzahl gefangener Moskitos nur noch halb so hoch, während direkt über dem Waldboden und in 1 m Höhe nur noch 1/5 der Anzahl an Moskitos gefangen werden konnten. Im Sekundärwald wurden in 16 m Höhe insgesamt die meisten Moskitos gefangen. In den Plantagen wurde zwischen den verschiedenen Fanghöhen kein signifikanter Unterschied festgestellt. Allerdings war die Moskitodichte (Anzahl gefangener Moskitos/Fangeinheit) in den Kaffee- und Kakao-Plantagen deutlich höher als in den Reis- und Mais-Feldern. Ein deutlicher Unterschied in der Moskitodichte wurde im Dorf zwischen den *Gravid Traps* und den *Light Traps* gemessen. Tagsüber wurden direkt über dem Boden mit den *Gravid Traps* drei Mal so viele Moskitos wie nachts in 1 m Höhe mit den *Light Traps* gefangen.

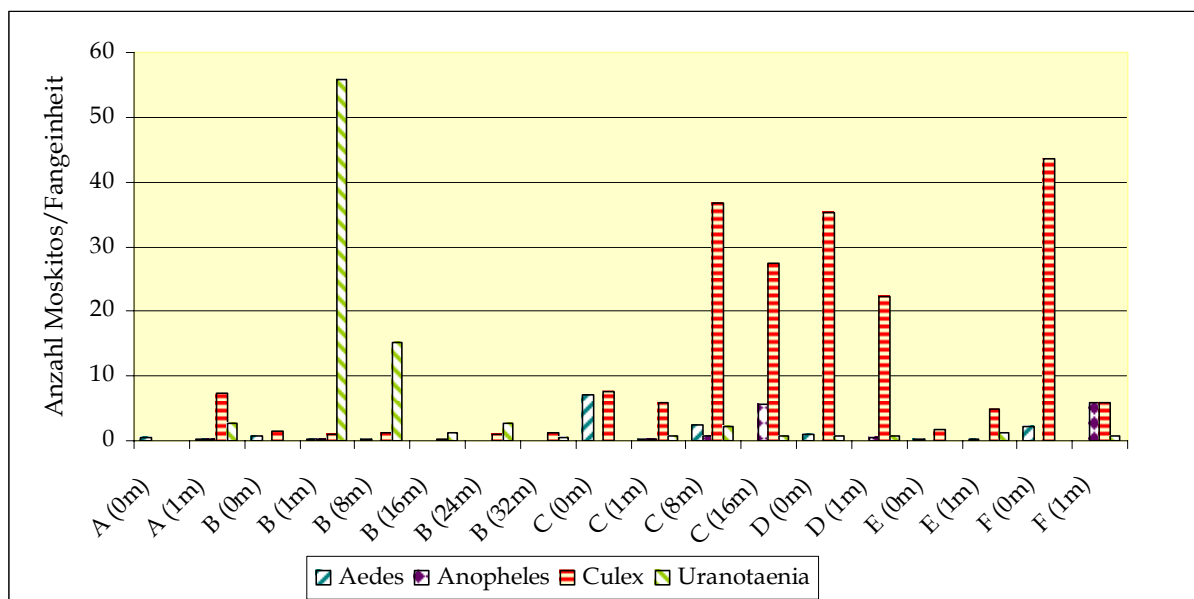


Abb. 4.2: Verteilung von *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* und *Uranotaenia* Arten in den verschiedenen Zonen und unterschiedlichen Höhen. Adulte Moskitos wurden tagsüber mit *Gravid Traps* und nachts mit *Light Traps* gefangen und anschließend an Hand von morphologischen Kriterien bestimmt. Die Fallen wurden an Camps im Primärwald (A), im Primärwald (B), im Sekundärwald (C), in Kaffee- und Kakao-Plantagen (D), in Reis- und Mais-Feldern (E) und im Dorf (F) installiert. Die Werte in Klammern geben die Höhe in Metern an in der die Falle angebracht war.

Die Genera *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* und *Uranotaenia* der Subfamilie *Culicinae* sind Überträger vieler humanpathogener Viren. Das Vorkommen an zu diesen Genera gehörigen Moskitos unterschied sich in den sechs ökologisch verschiedenen Zonen deutlich. So wurden Moskitos des Genus *Uranotaenia* fast ausschließlich im Primärwald, und dort in großer Anzahl in der Höhe von 1 m, gefangen, während Moskitos des Genus *Anopheles* fast ausschließlich im Dorf

gefunden wurden. *Culex*-Moskitos waren über die gesamten sechs Zonen verteilt, wobei die Dichte im Primärwald sehr gering war. Die Anzahl an *Aedes*-Moskitos war in allen Zonen niedrig, im Sekundärwald direkt über dem Waldboden allerdings etwas höher.

4.2 PCR-Screening der gepoolten Moskitokörper

Verschiedene Flaviviren, wie Gelbfieber Virus (YFV), West-Nil Virus (WNV) und Dengue Virus Typ 1-4 (DENV 1-4) sind für Côte d'Ivoire beschrieben und haben dort Epidemien unter der Bevölkerung ausgelöst. Außerdem ist eine Anzucht von Viren aus Moskitos, so genannten Wildisolaten in der Zellkultur schwierig und hängt stark von der Auswahl der geeigneten Zellen ab. Ein schwacher CPE kann in einem groß angelegten Screening möglicherweise übersehen werden. Daher wurde direkt aus allen gebildeten Pools (Moskitokörperpools) RNA extrahiert, eine cDNA-Synthese mit Random Primern durchgeführt (3.10.1, 3.11) und die Proben zunächst auf diese Erreger mittels *Real-Time* PCR getestet (Heid *et al.*, 1996). Die PCR-Systeme waren sensitiv bis zu zehn Kopien des Plasmidstandards. Als interne Inhibitoren-Kontrolle wurde ein synthetisch hergestelltes Plasmid zu den Proben gegeben, welches parallel mitgemessen wurde (Nitsche *et al.*, in Vorbereitung). Bei Reduktion der gemessenen Kopienzahl zur erwarteten Kopienzahl für dieses Plasmid wäre ein Hinweis auf das Vorhandensein von Inhibitoren in der Probe gegeben.

Alle 437 Pools waren negativ für die untersuchten Flaviviren. Die internen Plasmid-Kontrollen waren für jeden Pool positiv, so dass eine Hemmung der virusspezifischen PCRs durch Inhibitoren ausgeschlossen werden konnte.

4.3 Suche nach und Isolierung von Viren in der Zellkultur

4.3.1 Anzucht von Viren aus Moskitoköpfen

Alle weiblichen Moskitos (4839 Tiere) wurden nach Art, Fangort und Höhe in 437 Pools gruppiert und in jedem Pool Moskitoköpfe und Moskitokörper getrennt. Dabei wurden die Pools mit dem Buchstaben der Zone aus der die Moskitos isoliert wurden gekennzeichnet und durchnummeriert. Es wurden nur die weiblichen Tiere untersucht, da nur diese blutsaugend sind und als Vektoren in Frage kommen. Die Pools der Moskitoköpfe wurden in der Zellkultur zur Infektion von C6/36 und VeroE6/7 Zellen verwendet (3.4.2.1). Pools aus dem Sekundärwald, von den Kaffee- und Kakao-Plantagen und aus Taï wurden zusätzlich auf primäre Hühnerfibroblasten (CEF) gegeben, da primäre Zellkulturen in der

Regel durch die verschiedenen noch nicht ausdifferenzierten Zellen sensitiver als Kulturen von Zelllinien sind. Doch da auf diesen Zellen bei keinem der untersuchten Pools ein cytopathischer Effekt (CPE) festgestellt werden konnte, wurden zur Anzucht aus den restlichen Pools nur noch C6/36 und VeroE6/7 Zellen verwendet.

Bei 98 Pools (22,4 %) wurde ein CPE auf C6/36 Zellen beobachtet (Tab. 4.3). Die morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen variierten von Pool zu Pool stark. Eine Auswahl von verschiedenen CPEs ist in Abb. 4.3 dargestellt. Die Zellen, die mit dem Homogenat von Pool B3 infiziert wurden, lagerten sich zum einen nach 5 dpi (days post infection) aneinander und zum anderen bildeten sich schmale lang gezogene Zellen (Abb. 4.3 a). Bei den Zellen, die mit dem Homogenat aus Pool B14 infiziert wurden, zeigte sich schon nach 3 dpi eine Abrundung und Zusammenlagerung der Zellen (Abb. 4.3 b). Der CPE der Zellen, die mit Pool C23 und D24 infiziert wurden, war vergleichbar (Abb. 4.3 c, d). Allerdings war der CPE bei den Zellen, die mit Pool D24 infiziert wurden, stärker ausgeprägt. In beiden Zellkulturen waren nach 6 dpi große runde Zellen zu erkennen, welche durch Synzitenbildung entstanden sind. Die Zellen, die mit dem Homogenat von Pool F23 infiziert wurden, lagerten sich zum einen in Zellhaufen von 10 bis 20 Zellen zusammen und zum anderen bildeten sich längliche sehr schmale Zellen, die spitz ausgezogen waren (Abb. 4.3 e). Typisch für Zellkulturen, die mit dem Homogenat aus Pool F24 infiziert wurden, war ein schneller und starker CPE, der sich bereits nach 2 dpi zeigte (Abb. 4.3 f). Zwischen 20 und 50 Zellen lagerten sich zu Zellhaufen zusammen, die sich dann nach 3 dpi ablösten. Einige der zusammengelagerten Zellen fusionierten auch. In der Kultur, die mit dem Homogenat von Pool B81 infiziert wurde, waren nach 3 dpi starke morphologische Veränderungen zu erkennen (Abb. 4.3 g). Die Zellen fusionierten, ähnlich wie bei den Kulturen von Pool C23 und D24 beobachtet, zu großen Synziten.

In keinem Fall konnte ein CPE auf Vero Zellen oder CEF festgestellt werden. Vereinzelt wurde nach der Infektion dieser Zellen ein verlangsamtes Wachstum der Zellen und ein weniger dichter Zellrasen als in der Kontrollkultur beobachtet, was jedoch nach Passagierung nicht mehr zu sehen war. Nach der Infektion von Vero Zellen mit dem Pool B14 war nach drei Tagen ein starker CPE sichtbar (Abb. 4.4). Mit Überstand des primären Infektionsversuches auf Vero Zellen, konnte jedoch auf frischen Vero Zellen der CPE nicht reproduziert werden, wohingegen die Passagierung des Isolates auf C6/36 Zellen ohne Probleme auf diesen Zellen möglich war.

Tab. 4.3: Pools, die einen CPE auf C6/36 Zellen verursachten.

Pool	Herkunft	Moskito Art	Poolgröße*	Pool	Herkunft	Moskito Art	Poolgröße*
A4	AI	Culex spp.	20	C23	CII c	Cx. decens	6
A5	AI	Culex spp.	16	C28	CII a	x30, x37, x38 (Cx. Eum. spp.)	3
A11	AI	x10 (Cx Eum spp.)	20	C36	CII c	n.d. Weibchen	4
A21	AI	x10 (Cx Eum spp.)	10	C37	CII b	x23 (Cx. nebulosus spp.)	2
A24	AI	Pseudoficalbia spp.	20	C43	CI b	Cx. nebulosus	17
A26	AI	Cx. nebulosus	10	C45	CI a	Cx. nebulosus	16
A28	AI	Cx. nebulosus	22	C48	CI b	Cx. nebulosus	1
A31	AII	Culex spp.	9	C51	CI b	Cx. decens	20
A45	AIII	Cx. telesilla	11	C54	CI b	Cx. decens	20
A52	AIII	n.d. Weibchen	8	C56	CI b	Cx. decens	20
B1	BVa	Ur. mashoaensis	20	C57	CI b	Cx. decens	20
B3	BVa	Ur. mashoaensis	20	C58	CI b	Cx. decens	13
B4	BVa	Ur. mashoaensis	20	C59	CI b	Cx. decens	20
B14	BVa	n.d. Weibchen	17	C60	CI b	Cx. decens	9
B15	BVa	x23 (Cx nebulosus spp.)	1	C64	CI b	Cx. Eumelanomyia	10
B21	BVb	n.d. Weibchen	20	C65	CI b	Cx. Eumelanomyia	8
B22	BVb	n.d. Weibchen	21	C68	CI b	x27 (Cx. Eum. spp.)	21
B24	BVb	x27 (Cx Eum spp.)	3	C70	CI b	x28, x29, x32, x33	11
B31	BVd	Ur. mashoaensis	10	C74	CI b	x8 (Cx nebulosus spp.)	20
B40	BV	n.d. Weibchen	2	C75	CI b	x8 (Cx nebulosus spp.)	20
B42	BIV	Cx. cinerellus	9	C79	CI	Aedes harrisoni	6
B51	BIVa	Cx. Eum. spp.	2	C82	CI b	Anopheles	20
B66	BIIIe	n.d. Weibchen	9	C86	CI a	n.d. Weibchen	10
B81.1	BIId	Ur. Uranotaenia spp.	4	C88	CI b	n.d. Weibchen	20
B81.2	BIId	Ur. Uranotaenia spp.	4	C89	CI b	n.d. Weibchen	21
				C92	CI b	n.d. Weibchen	20
C15	CIII b	x25	6	C93	CI b	n.d. Weibchen	20
C21	CII b	Cx. decens	19	C95	CI b	n.d. Weibchen	20

Pool	Herkunft	Moskito Art	Poolgröße*	Pool	Herkunft	Moskito Art	Poolgröße*
D23	DII	x40 (Cx.), x51 (Ae. harrisoni spp.), x52 (Cx. Eum. spp.), x57 (Cx. Eum. spp.)	18	F13	FII	An. gambiae	32
D24	DII	x55 (Cx. Eum. spp.)	23	F14	FII	An. buxtoni, An. keniensis, An. dancalicus, An. obscurus, An. rivulorum, An. smithii, An. tenebrosus, An. wel. welcomei	16
D25	DII	x55 (Cx. Eum. spp.)	4				
D26	DII	n.d. Weibchen	3				
D28	DI	Anopheles	17	F17	FII	Cx. annulioris	10
D30	DI	Culex, Cx. Cx., Cx. Eum.	21	F22	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	10
D50	DI	x4 (Cx nebulosus spp.)	20	F23	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	20
D51	DI	x4 (Cx nebulosus spp.)	20	F24	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	30
D59	DI	n.d. Weibchen	14	F25	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	21
D60	DI	n.d. Weibchen	15	F26	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	50
D61	DI	x25	11	F27	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	40
D62	DI	x44 (Cx Eum. spp.)	14	F28	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	20
				F30	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	20
E9	EII	Ur. Chorleyi	7	F32	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	15
				F33	FII	x4 (Cx nebulosus spp.)	12
F3	FII	Ae. Harrisoni	9	F35	FII	x6 (Cx nebulosus spp.)	16
F4	FII	Ae. mettalicus, Ae. Mucidus	7	F45	FI	Culex	20
F5	FII	Anopheles	5	F47	FI	Cx. Eum.	25
F6	FII	Anopheles	10	F50	FI	Cx. quinquefasciatus	17
F7	FII	Anopheles	19	F53	FI	Cx. cineris, Cx. thalassius, x17 (Cx spp.), x19 (Cx spp.), x20 (Cx spp.), x21 (Cx spp.), x22 (Cx spp.)	14
F8	FII	Anopheles	30				
F9	FII	Anopheles	50				
F10	FII	An. gambiae	5				
F11	FII	An. gambiae	10	F54	FI	Cx. horidus	4
F12	FII	An. gambiae	20	F55	FI	Cx. nebulosus	1

Moskitos, die nicht bis zur Art bestimmt werden konnten, sind mit x bezeichnet und durchnummeriert; sofern Angaben zur morphologischen Identifizierung gemacht werden konnten, stehen diese in Klammern; n.d. Weibchen = nicht bestimmte Weibchen; AI= Nordcamp, AII= Assistentencamp Nord, AIII= Camp Noë, AIV= Station, BI-BV= Primärwald, CI-CIII= Sekundärwald, DI= Kakaopflanzungen, DII= Kaffeeplantagen, EI= Reisfeld, EII= Maisfeld, FI= Tai, FII= Gouléako, * = Anzahl der in dem Pool befindlichen Moskitos.

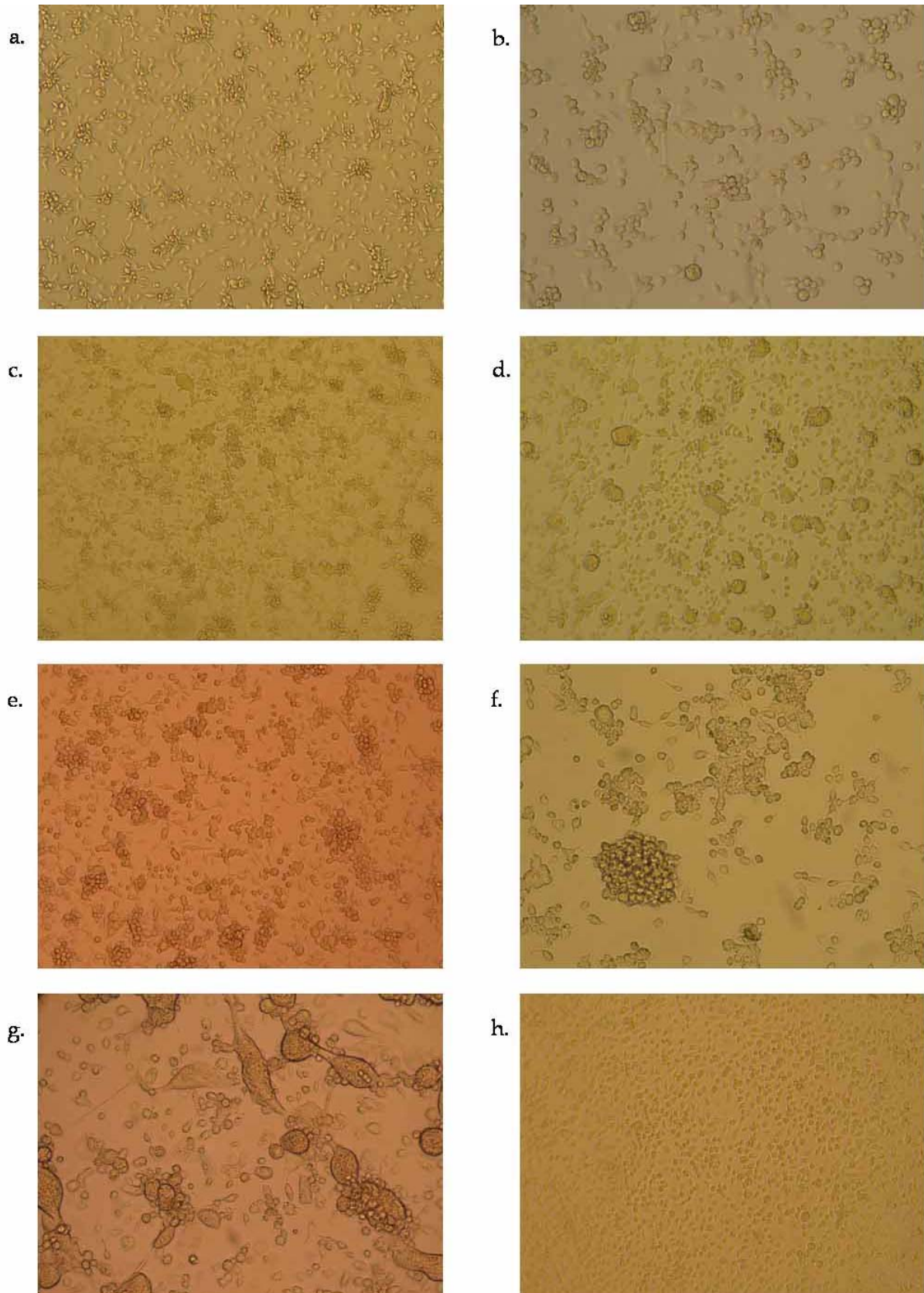


Abb. 4.3: CPE auf C6/36 Zellen. Homogenisierte Pools von Moskitoköpfen wurden in C6/36 Zellkulturen inokuliert und bei 28°C ohne CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch auf cytopathische Veränderungen untersucht. a. B3, 5dpi; b. B14, 3dpi; c. C23, 6dpi; d. D24, 6 dpi; e. F23, 6 dpi; f. F24, 2 dpi; g. B81, 5 dpi, h. Kontrolle, 3 dpi. Aus Tab. 4.3 sind weitere Angaben zu den Pools zu entnehmen.

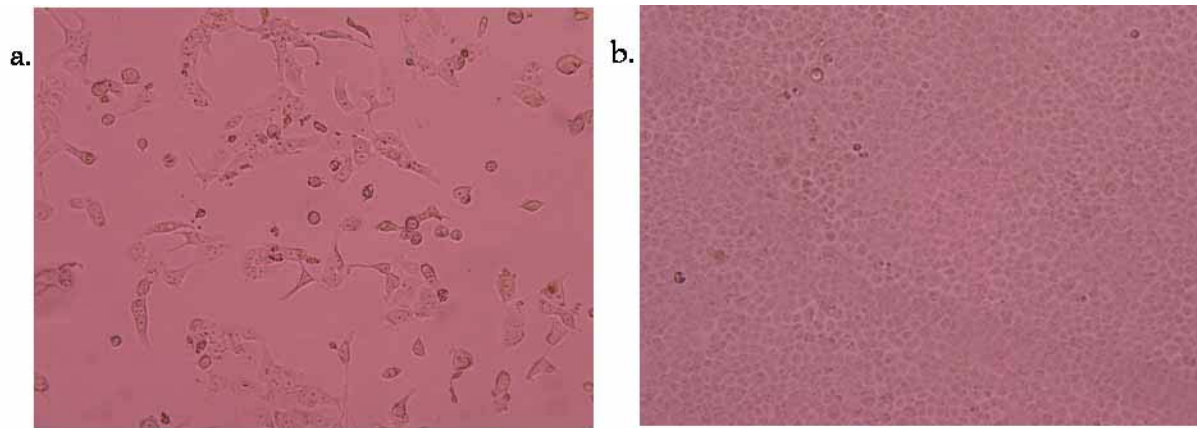


Abb. 4.4: CPE des Pools B14 auf Vero Zellen. Homogenisierte Moskitoköpfe des Pools B14 wurden in Vero Zellen inokuliert, bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und täglich mikroskopisch beobachtet (Primärisolationsversuch). a. B14 3 dpi, b. Vero mock infiziert. Vergleich auch Abb. 4.3 b.

4.3.2 Anzuchtversuche mit Virusüberständen von Pools der Zone C (Sekundärwald) auf Primatenzellen

Der Sekundärwald besitzt teilweise noch die Vegetation des primären Regenwaldes, Temperatur und Luftfeuchtigkeit aber sind ähnlich wie außerhalb des Nationalparks, da der Wald nicht so dicht und hoch ist und die Sonneneinstrahlung dieses Gebiet stark erhitzt und austrocknet. Von daher kann man diese Zone von den ökologischen Bedingungen als Übergangs- bzw. Mischzone bezeichnen, wo eine Übertragung von Erregern auf neue Wirte und in ein neues Ökosystem bevorzugt stattfinden könnte. Mit allen Virusüberständen von Pools dieser Zone, die auf C6/36 Zellen einen CPE verursacht haben, sollte noch einmal eine Virusvermehrung auf Primatenzellen versucht werden, um das Infektionsrisiko für Menschen und Affen abschätzen zu können.

Dazu wurden die titrierten Überstände von infizierten C6/36 Zellen mit einer MOI von 1 auf VeroE6/7 Zellen gegeben. Im Unterschied zu den vorangegangenen Anzuchtversuchen wurden die Zellen drei Mal passagiert und täglich mikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht. Nach der dritten Passage wurde der Überstand auf C6/36 Zellen austitriert, um auch eine mögliche Vermehrung der Viren auf den Primatenzellen ohne zellmorphologische Veränderungen feststellen zu können.

Keine der infizierten Vero Kulturen zeigte einen CPE. Zwar wiesen einige Kulturen ein verlangsamtes Wachstum auf, aber auch hier konnte keine Virusreplikation festgestellt werden, als die Überstände auf C6/36 titriert wurden. Bei keiner der Kulturen konnte nach drei Passagen auf VeroE6/7 Zellen auf C6/36 Zellen ein infektiöses Virus gemessen werden. Die aus den Pools der Zone C isolierten Viren waren nicht in der Lage sich in Vero Zellen zu vermehren.

4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Der Zellkulturüberstand von 30 stichprobenartig ausgewählten Pools der Zonen B bis F (Primärwald bis Dorf), die einen CPE auf C6/36 Zellen ausgelöst hatten, sollte elektronenmikroskopisch untersucht werden. Um eine ausreichend hohe Konzentration an Viruspartikeln sicher zu stellen, wurden Überstände aus durchinfizierten Zellkulturen (175 cm²) aufgereinigt und durch Ultrazentrifugation pelletiert.

In sieben Pools konnten virale Partikel mit dem Elektronenmikroskop dargestellt und morphologisch Virusfamilien zugeordnet werden. In weiteren 10 Pools wurden virusähnliche Partikel sichtbar, die jedoch bisher morphologisch nicht eindeutig Virusfamilien zugeordnet werden konnten (Tab. 4.4, Vergleich auch Tab. 4.3).

Tab. 4.4: Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung von 30 Pools, die in der Zellkultur einen CPE verursacht haben und morphologische Zuordnung.

Virus	Virusähnliche Partikel	Negativ
B3: Flavivirus	C21: 60-80 nm Partikel	C28, C36,
B14: Orbivirus	D23: 40-90 nm Partikel	C43, C45,
C15: Rhabdovirus	D28: ca. 100 nm Partikel	C48, C51,
C23: Rhabdovirus	D50: 50 nm Partikel, keine Oberflächenstrukturen	C64, C65,
D24: Rhabdovirus	D51: Partikel <100 nm	D25, D26,
F23: Bunyavirus	D59: 120-140 nm Partikel, Hüllproteine	D30, D61
F24: Coronavirus	D60: 50-60 nm und 80-100 nm Partikel	D62
	D62: 120-140 nm Partikel, Hüllproteine	
	F27: ca. 100 nm Partikel	
	F30: < 100 nm Partikel	

Die Anzuchten aus Pool B3, bestehend aus *Uranotaenia mashaensis* Moskitos, die im Primärwald 1 m über dem Waldboden gefangen wurden, enthielt virale Partikel, die charakteristisch für Flaviviren sind. Ein weiterer Pool aus dem Primärwald (B14), der aus nicht weiter bestimmten weiblichen Moskitos zusammengesetzt ist, die ebenfalls in 1 m Höhe gefangen wurden, enthielt in hoher Konzentration runde virale Partikel von 70-80 nm im Durchmesser. Die einzelnen Virionen zeigten eine definierte Oberflächenstruktur mit einem Capsomer in Form eines Ringes, welches charakteristisch für Partikel von Orbiviren ist. Viren mit einer Morphologie von Rhabdoviren wurden in einem Pool (D24) von *Cx. Eum. spp.* (x55), die in Kaffee-Plantagen gefangen wurden und in zwei Pools aus dem Sekundärwald, einer bestehend aus *Culex decens* Moskitos (C23) in 16 m Höhe gefangen und einem Pool aus x25 Moskitos (C15), die in 8 m Höhe gefangen wurden, nachgewiesen. Ein corona-ähnliches Virus (Pool F24) und ein Bunyavirus (Pool F23) wurden in Pools aus *Cx. nebulosus spp.* (x4) Moskitos, die in der Kleinstadt Taï gefangen wurden, detektiert (Abb. 4.5).

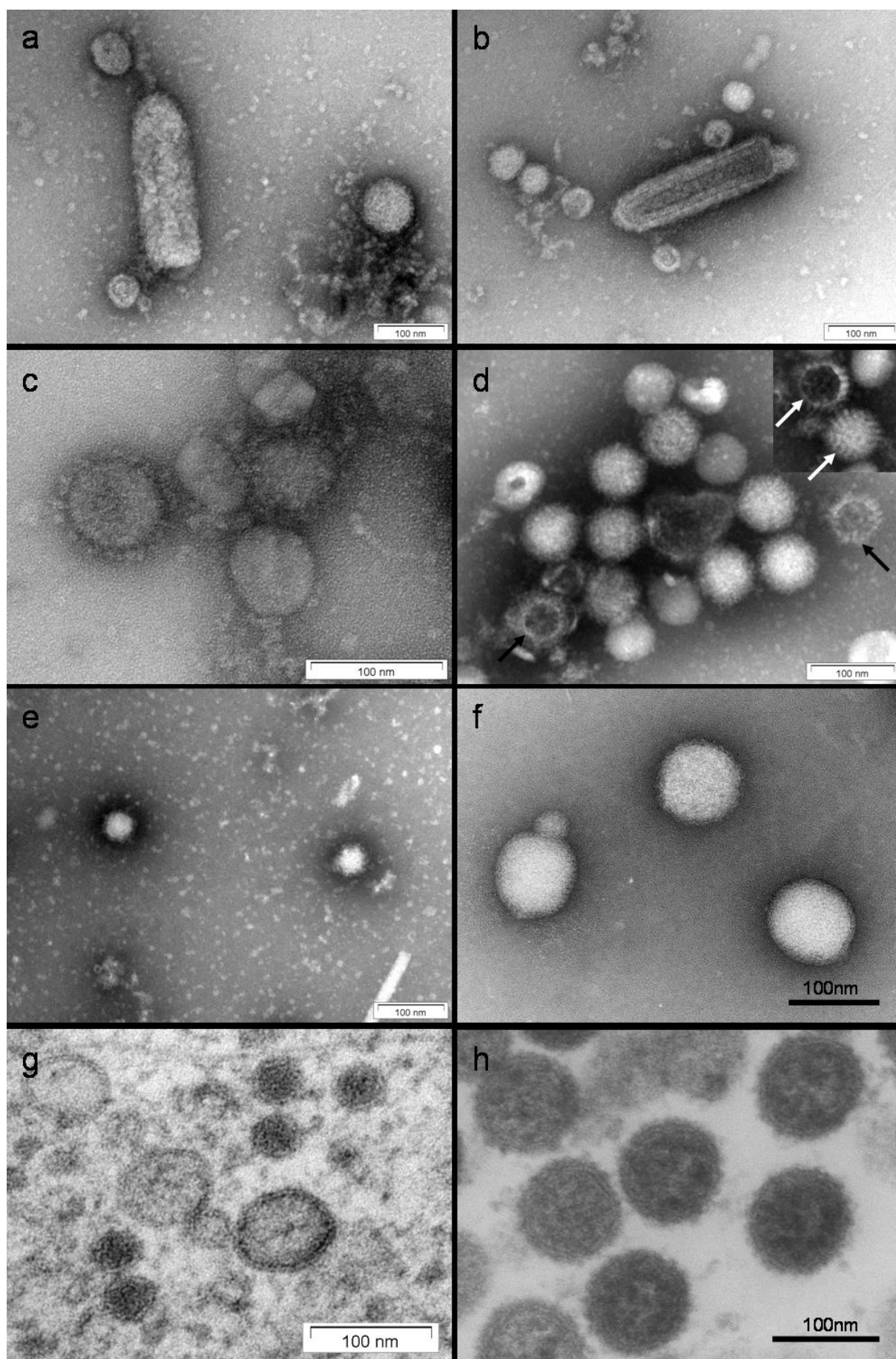


Abb. 4.5: Elektronenmikroskopische Darstellung der Viren. Transmissions- elektronenmikroskopische Aufnahme der Viren, die auf C6/36 Zellen einen CPE gezeigt haben und Ultradünnschnitte von infizierten C6/36 Zellen. a., b. Aus Pool D24 (a), bzw. Pool C23 (b) isolierte Viren, die die patronenförmige Gestalt von Rhabdoviren aufweisen, c. Aus Pool F24 isolierte Viren zeigten 80 nm Partikel mit Coronavirus ähnlichem Aussehen, d. Aus Pool B14 isolierte Viren wiesen runde, im Durchschnitt 70-80 nm Partikel auf, die kein regelmäßiges Muster besitzen, aber innere Kapside mit einem Durchmesser von 60 nm (Pfeil), welche charakteristisch für Mitglieder der Familie *Reoviridae* sind, e., g. Aus Pool B3 isolierte Viren zeigten runde, sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 40-60 nm, die im Negativ Staining die morphologische Gestalt von Flaviviren besitzen, f., h. Aus Pool F23 isolierte Viren wiesen behüllte, pleomorphe Partikel im Durchschnitt zwischen 90-110 nm groß, auf, die unterschiedliche Oberflächenprojektionen zeigten, die charakteristisch für Bunyaviren sind. a.-f Negativ Staining der Viren, die durch ein 36% Succhrose Kissen pelletiert wurden, a-c, f 1% Uranyl Acetat; d, e 1% Phosphotungstatact; g., h. Ultradünnschnitte, 1% Uranyl Acetat.

4.5 PCR-Screening der CPE verursachenden Pools aus der Zellkultur

Insgesamt verursachten 98 Pools auf C6/36 Zellen einen CPE (22,4%). Aus Kulturüberstand dieser Zellen wurde RNA extrahiert und cDNA mit Random Primern synthetisiert (3.10.2, 3.11). Zuerst wurden diese wie die gepoolten Moskitokörper mittels *Real-Time* PCR auf YFV, WNV und DENV 1-4 getestet. Zusätzlich wurden die Proben mit einer generischen Flavi-PCR untersucht, welche mit Hilfe von degenerierten Primern viele verschiedene Flaviviren erkennen kann (Nitsche *et al.*, in Vorbereitung). Alle PCR-Systeme konnten bis zu zehn Kopien des Plasmidstandards detektieren.

Alle 98 Proben waren negativ für YFV, WNV und DENV 1-4. Der Überstand des Pools B3 von C6/36 Zellen und der des Pools B14 von VeroE6/7 Zellen waren jedoch positiv in der generischen Flavi-PCR. Im Überstand des Pools B3 konnten Kopienzahlen von über 10^6 Kopien/ml detektiert werden, der Überstand des Pools B14 hingegen zeigte weniger als 10 Kopien/ml. Die Sequenzierung der PCR-Produkte mit einer Länge von 120 bp und ein Vergleich mit Sequenzen aus den öffentlichen Sequenzdatenbanken ergab für keinen Pool eine eindeutige Zuordnung zu einem bekannten Virus. Das Virusisolat aus Pool B3 zeigte geringe Verwandtschaft zu zwei Flaviviren, zu Edge-Hill Virus, strain P1553 NS5 Protein Gen, 66/77 bp (77 %) und zu Kedougou Virus Polyprotein Gen, 32/38 bp (34 %). Bei der Sequenzanalyse des Virusisolats aus Pools B14 (auf VeroE6/7 Zellen gewachsen) konnte keine Homologie zu einer bekannten Sequenz gefunden werden.

4.6 Charakterisierung ausgewählter Virusisolate

4.6.1 Untersuchungen des Virusisolats aus Pool B3

Bei den bisherigen Untersuchungen des Pools B3 zeigten sich im Elektronenmikroskop im Überstand von infizierten C6/36 Zellkulturen Flavivirus-ähnliche Partikel. Das Virus war in einer Flavivirus-generischen PCR positiv und die aus dem PCR-Produkt erhaltenen Sequenzinformationen deuteten auf eine Verwandtschaft zu Flaviviren hin. Im Folgenden sind Untersuchungen zur Charakterisierung des Virus beschrieben.

4.6.1.1 Untersuchungen in der Zellkultur

4.6.1.1.1 Wachstumskinetik

Zur Bestimmung des Wachstumverhaltens des aus Pool B3 isolierten Virus, wurde eine Wachstumskinetik über sieben Tage aufgenommen.

Dazu wurden C6/36 Zellen in Doppelwerten mit Virusüberstand aus dem Pool B3 mit einer MOI von 0,01 infiziert und in 24 Stunden Abständen von 0 bis 7 Tagen nach Infektion (dpi) Überstand genommen. Zum einen wurde dieser auf C6/36 Zellen titriert, um den Virus-Titer zu bestimmen. Zum anderen erfolgte eine RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mit Random Primern, welche in einer in dieser Arbeit für B3 etablierten spezifischen *Real-Time* PCR eingesetzt wurde, um die Anzahl an Genomkopien zu ermitteln (4.6.1.2.4).

Von 0 dpi bis 5 dpi war ein stetiger Anstieg im Virustiter, als auch in der Anzahl an Genomkopien zu messen (Abb. 4.6). Nach fünf Tagen wurde mit $7,9 \times 10^6$ Viren/ml die Plateauphase erreicht und es konnte keine Zunahme von infektiösem Virus festgestellt werden. Zwischen 5 und 7 Tagen nach Infektion war kein signifikanter Unterschied zwischen infektiösem Titer und Anzahl der Genomkopien/ml festzustellen.

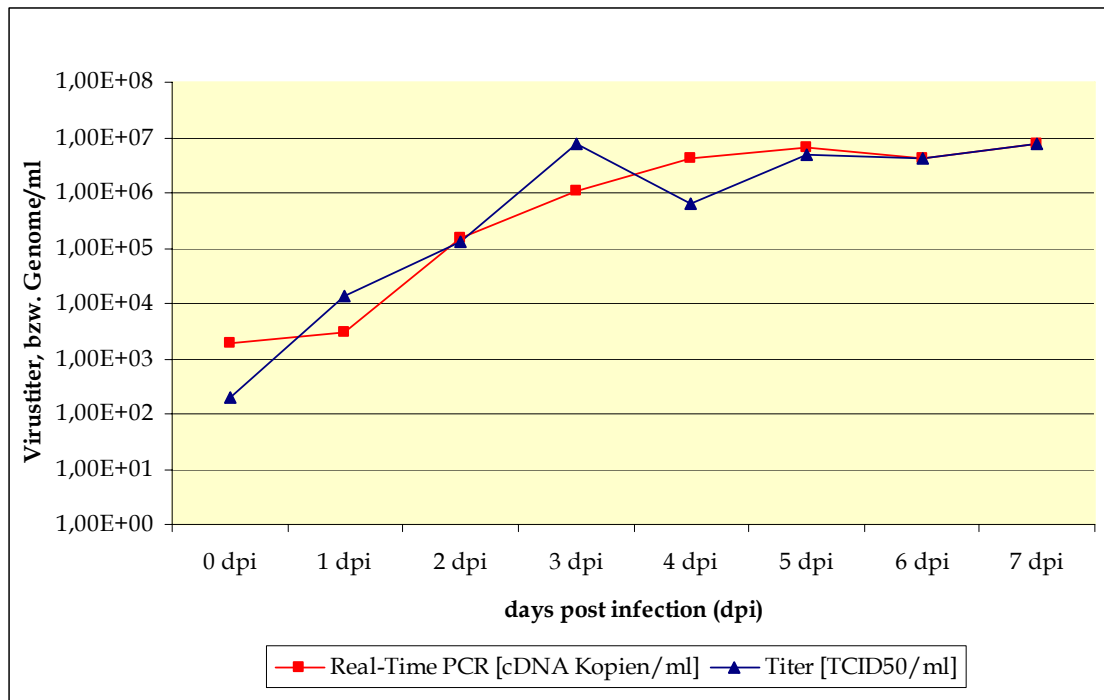


Abb. 4.6: Wachstumskinetik des aus dem Pool B3 isolierten Virus. Von 0 bis 7 dpi wurde Überstand genommen und zur Titration und RNA-Extraktion verwendet. Die mit Random Primern synthetisierte cDNA wurde in einer B3 spezifischen *Real-Time* PCR eingesetzt. Die gemessenen ct-Werte wurden mit Hilfe von Standardreihen quantifiziert und auf Kopien cDNA/ml Zellkulturüberstand umgerechnet.

4.6.1.1.2 Untersuchungen zur Virushülle

Um zu untersuchen, ob es sich um ein behülltes oder unbehülltes Virus handelt, wurde der Überstand der infizierten Zellkultur mit Äther behandelt und auf C6/36 Zellen in drei Verdünnungsstufen austitriert. Während behüllte Viren durch diese Behandlung ihre Virushülle und damit ihre Infektiosität verlieren, sollten unbehüllte Viren diese Behandlung ohne wesentlichen Verlust der Infektiosität überstehen. Als Kontrolle wurde virushaltiger Zellkulturüberstand in Medium inkubiert und ebenfalls auf C6/36 Zellen in drei Verdünnungsstufen austitriert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch sieben Tage nach Infektion.

In keiner Verdünnungsstufe der mit Äther behandelten Überstände, war ein CPE zu erkennen. Die Kontrollen mit unbehandelten Überständen zeigten einen stark ausgeprägten CPE. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass das aus dem Pool B3 isolierte Virus eine Hülle besitzt.

4.6.1.1.3 Infektionsversuche mit verschiedenen Zelllinien

Zur Untersuchung des möglichen Wirtsspektrums des Erregers aus dem Pool B3, wurden verschiedene Zelllinien mit diesem Virus infiziert. Dazu wurden eine Nager- (BHK), zwei Primaten- (VeroE6/7, VeroB4), und drei menschliche Zelllinien (A549, 293 und Hep2) ausgesät und am nächsten Tag mit einer MOI von 1 mit dem Virusisolat infiziert. Da der Erreger auf Insektenzellen bei 28°C kultiviert wurde, wurden für diesen Infektionsversuch zwei verschiedene Temperaturen gewählt. Zum einen wurden die Zellen bei 37°C inkubiert und in einem zweiten Ansatz bei 33°C, um der Temperatur bei der das Virus auf den C6/36 Zellen replizierte, etwas näher zu kommen. Die Zellen wurden drei Mal passagiert und täglich mikroskopisch untersucht. Nach drei Passagen wurde der Überstand jeder Zelllinie auf den Insektenzellen austitriert und in der Pool B3 Virus spezifischen *Real-Time* PCR getestet (4.6.1.2.4).

Keiner der Überstände löste auf C6/36 Zellen einen CPE aus und in keinem Überstand der verschiedenen Zelllinien konnten nach drei Passagen Genomkopien des Virus gemessen werden. Eine Replikation des Erregers aus dem Pool B3 konnte daher auf keiner der sechs Mammalier-Zelllinien nachgewiesen werden.

4.6.1.1.4 Untersuchungen zur Virusreplikation in C6/36 Zellen

Um die Virusreplikation des Flavivirus-ähnlichen Erregers aus Pool B3 in C6/36 Zellen nachvollziehen zu können, wurden die Zellen zum einen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion in Ultradünnschnitten elektronenmikroskopisch untersucht und zum anderen Virusantigene in infizierten Zellen mittels eines Kaninchen anti-Pool B3 Virus-Serums nachgewiesen (3.23.2).

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden C6/36 Zellen mit Pool B3-Viren der 4. Passage mit einer MOI von 0,1 infiziert. Die Zellen wurden nach 25 h, 32 h, 48 h und 72 h mit PFA fixiert. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen nach 3 dpi, 4 dpi, 5 dpi, 6 dpi fixiert. Die Zellen wurden zu Ultradünnschnitten verarbeitet und elektronenmikroskopisch ausgewertet (3.9.2).

Infizierte und fixierte C6/36 Zellen wurden mit Kaninchen-Serum, welches 42 Tage nach Immunisierung gewonnen worden war, inkubiert (3.23.2). Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Kaninchen-spezifischen α -IgG-Sekundärantikörper (Cy3 markiert) und eine Zellkernfärbung mit DAPI. Die Auswertung der Proben erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

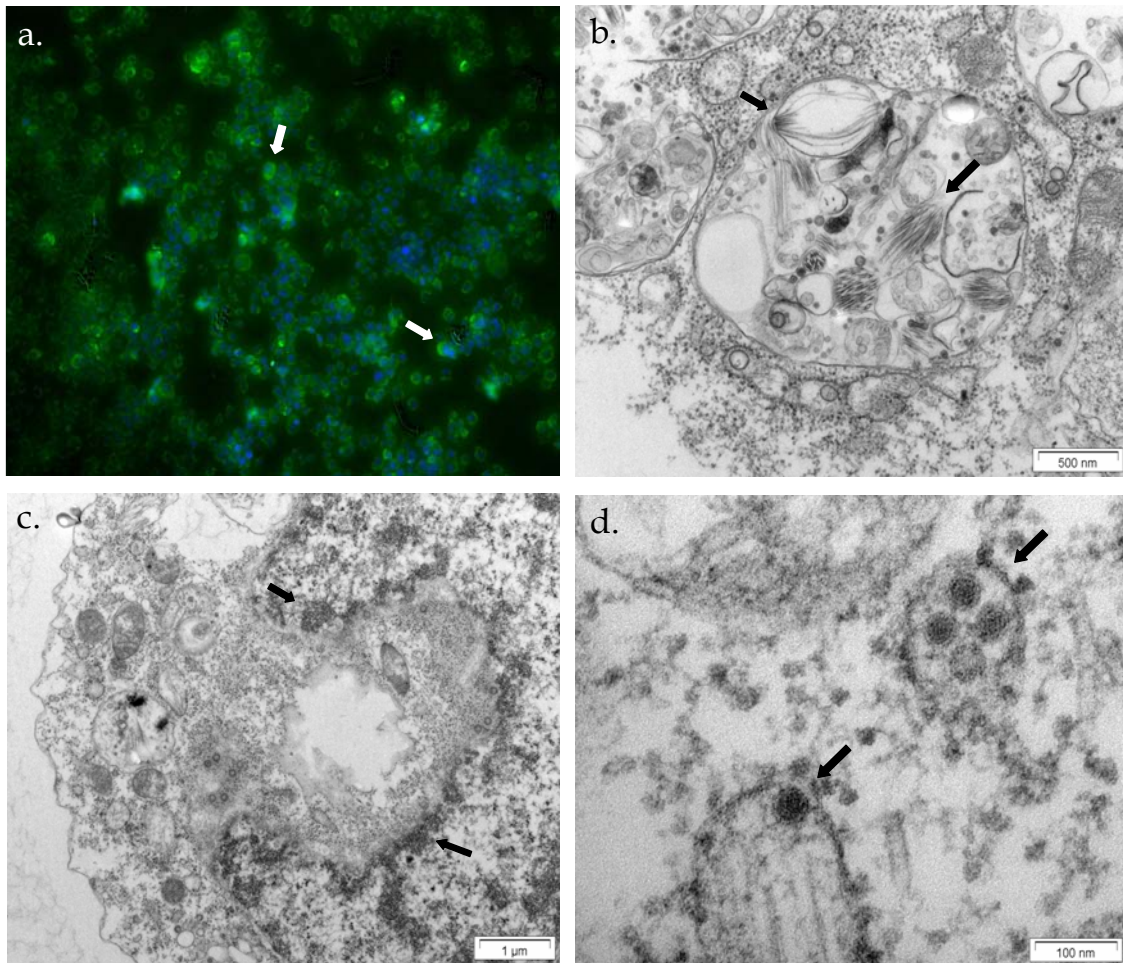


Abb. 4.7: Immunfluoreszenztest des Erregers aus Pool B3 in infizierten C6/36 Zellen und elektronenmikroskopische Darstellung infizierter C6/36 Zellen in Ultradünnschnitten. a. Immunfluoreszenztest. Fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper markiert mit Cy3, Zellkernfärbung mit DAPI, b-d Ultradünnschnitte. Pfeile a, c starke Anhäufung von Virusantigenen in den Zellen in der Nähe der Zellwand, b Bildung tubulärer Strukturen in infizierten Zellen, d. Anlagerung von Virusantigenen an das endoplasmatische Retikulum (ER). IFT und EM Aufnahmen nach 3 dpi.

Dabei ließen sich Antigene des Pool B3-Virus spezifisch nachweisen (Abb. 4.7a). Virusantigene wurden nur im Cytoplasma, meist in Zellwandnähe, und nicht im Zellkern gefunden (Abb. 4.7 a, c). In infizierten Zellen kann nach 3 dpi eine massive Virusproduktion nachgewiesen werden (Abb. 4.7 c). Die Virusreplikation scheint ausschließlich im Cytoplasma stattzufinden, wie es für Flaviviren beschrieben wurde. Die Morphogenese zu infektiösen Partikeln erfolgt bei Flaviviren an der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) (van Regenmortel *et al.*, 2000). Eine Anlagerung von Viruspartikeln an das ER ist in den Ultradünnschnitten infizierter Zellen zu erkennen (Abb. 4.7 d). Außerdem wurde eine starke Ausbildung von tubulären Strukturen nach Infektion beobachtet (Abb. 4.7 b). Eine Erklärung für die Anhäufung solcher Strukturen gibt es nicht. Sie könnten dem Transport von Viruspartikeln innerhalb der Zelle dienen.

4.6.1.2 Molekulargenetische Untersuchungen

4.6.1.2.1 Amplifikation von viralen Genomfragmenten

Um Sequenzinformationen von diesem Virus zu erhalten, wurde die von Stang *et al.* (2005) beschriebene Methode angewendet. Hierbei erfolgt mit Random Primern, an die am 5'-Ende eine Ankersequenz gebunden ist, unter Verwendung einer reversen Transkriptase aus der RNA eine cDNA-Doppelstrangsynthese (3.20). Die cDNAs können mit Hilfe der Ankersequenz amplifiziert und über Klonierung und anschließende Sequenzierung analysiert werden.

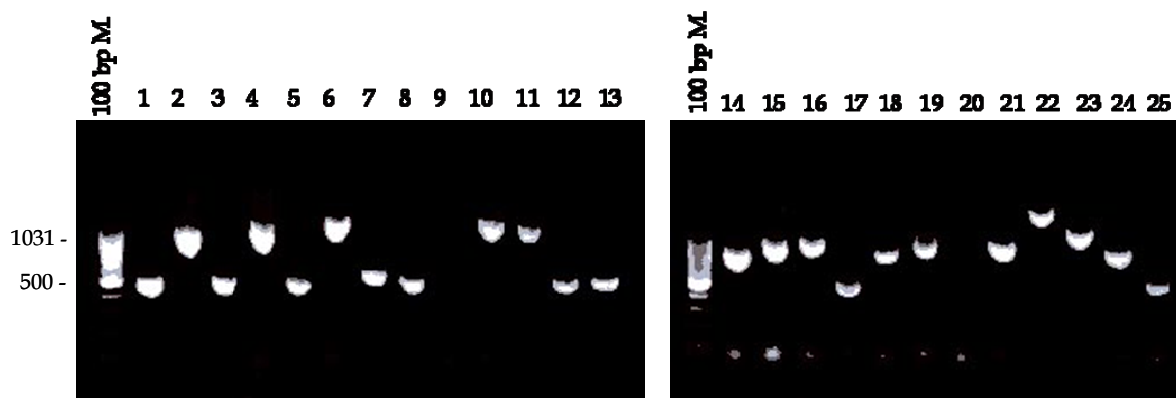


Abb 4.8: Dargestellt sind die Ergebnisse der Kolonien-PCR von Klonen (1-25) der Random-Amplifikate des Virusisolats aus Pools B3 auf einem 1,5 %igen Agarosegel. Überstand von Pool B3-infizierten Zellen wurde aufkonzentriert, RNA extrahiert und mit Random Primern cDNA synthetisiert. In der PCR erfolgte eine Amplifikation durch für die Ankersequenz spezifische Primer. Die PCR-Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Einzelne Kolonien wurden mit vektorspezifischen Primern auf Inserts getestet. Die 500 und 1031 bp Banden des Molekulargewichtsmarkers sind eingezeichnet. Die untersuchten Klone sind mit Zahlen bezeichnet (s. Tab. 4.5).

Es wurden 25 Klone in der Kolonien PCR (3.16) auf die Größe der enthaltenen Inserts untersucht (Abb. 4.8). Die Klone 9, 17, 20 und 25 wurden auf Grund von fehlenden Inserts verworfen und die restlichen 21 Klone sequenziert und mit Hilfe der Datenbank (NCBI BLAST) analysiert. Neun Klone beinhalten Genomabschnitte, die aus den C6/36 Zellen stammen und ein Klon beinhaltet nur Vektorsequenz. Die anderen elf Sequenzen konnten in fünf Sequenzsegmente (Contigs) gruppiert werden, welche alle über kurze Nukleotidsequenzen Verwandtschaft zu Flaviviren zeigten (Tab. 4.5). Das längste Contig von 1500 bp (Contig 1) zeigte über einen kurzen Sequenzbereich eine geringe Verwandtschaft zu Dengue Virus Typ 2 (45/56 Nukleotiden, 80 %). Ein anderes Contig (Contig 4) in der Länge von 899 bp war über einen kurzen Sequenzbereich mit Zika Virus (63/72 Nukleotiden, 87 %) and Rocio Virus (60/72 Nukleotiden, 83 %) verwandt. Contig 2 zeigte zwar die Homologien zur gleichen Genomposition von Zika Virus wie Contig 4,

jedoch sind die Sequenzen der beiden Contigs verschieden. Eine Verwandtschaft über einen längeren Sequenzbereich wurde zwischen einem 730 bp Contig (Contig 5) und Gelbfieber Virus Strain 85-82H Ivory Coast (232/305 Nukleotiden, 76 %) gefunden. Contig 3 war 749 bp lang und zeigte Homologien zu St.-Louis-Enzephalitis Virus (284/381 Nukleotiden, 74 %). Weitere Homologien zu in der Datenbank veröffentlichten Sequenzen wurden nicht gefunden. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass das Pool B3-Virus mit anderen Flaviviren verwandt ist und aller Wahrscheinlichkeit nach ein neues Isolat in der Familie der *Flaviviridae* darstellt. Vorschlagsweise erhält dieses Isolat den Namen Tai Forest Virus (TFV), wobei das Isolat aus Pool B3 als TFV B3 bezeichnet wird.

Tab. 4.5: Sequenzanalyse der Amplifikate von viralen Genomfragmenten des Erregers aus dem Pool B3 (TFV) mit NCBI BLAST.

Contig	Klon	Länge (bp)	Verwandtschaft Nukleinsäureebene
1	10, 15, 21 22	1500	Dengue Virus Typ 2 strain C0167 (45/56 nt, 80%) ^a , 6099-6154 ^b
2	14, 24	529	Zika Virus Polyprotein Gen (63/72 nt, 87%) ^a , 4596-4667 ^b ;
3	11	749	Rocio Virus 73%, Ilheus Virus 86% St.-Louis-Enzephalitis Virus (286/381 nt, 75%) ^a , 9624-10004 ^b ; St.-Louis-Enzephalitis NS5 Protein (323/443 nt, 73%) ^a , 562-1004 ^b ; Zika Virus (329/453 nt, 72%) ^a , 9516-9968 ^b
4	3, 6, 19	899	Zika Virus (63/72 nt, 87%) ^a , 4596-4667 ^b ; Rocio Virus (60/72 nt, 83%) ^a , 4594-4665 ^b
5	16	730	Gelbfieber Virus strain 85-82H Ivory Coast (232/306 nt, 75%) ^a , 8819-9123 ^b ; Dengue Virus Typ 2 China Isolat 04, (115/141 nt, 81%) ^a , 8923-9062 ^b ; Zika Virus (136/174 nt, 78%) ^a , 8905-9077 ^b

^a Nukleotidhomologie, ^b Homologie zu Position innerhalb des gesamten Genoms

4.6.1.2.2 Sequenzierung des Genoms

Die aus der Random-Amplifizierung erhaltenen fünf Contigs waren zu unterschiedlichen Positionen entlang des Genoms verschiedener Flaviviren homolog. An Hand dieser Homologien wurden die fünf Contigs in einer möglichen Reihenfolge angeordnet und sogenannte „out-Primer“ entwickelt, die ausgehend von den ermittelten Sequenzen nach außen zeigen (Tab. 3.2). Durch die Kombination verschiedener Primer sollte versucht werden, benachbarte Sequenzen durch PCR miteinander zu verbinden (Abb. 4.9). Die

Sequenz des Contigs 3 zeigte dabei Homologien zu den 5'- und 3'-Enden St.-Louis-Enzephalitis Virus (SLEV) Genoms.

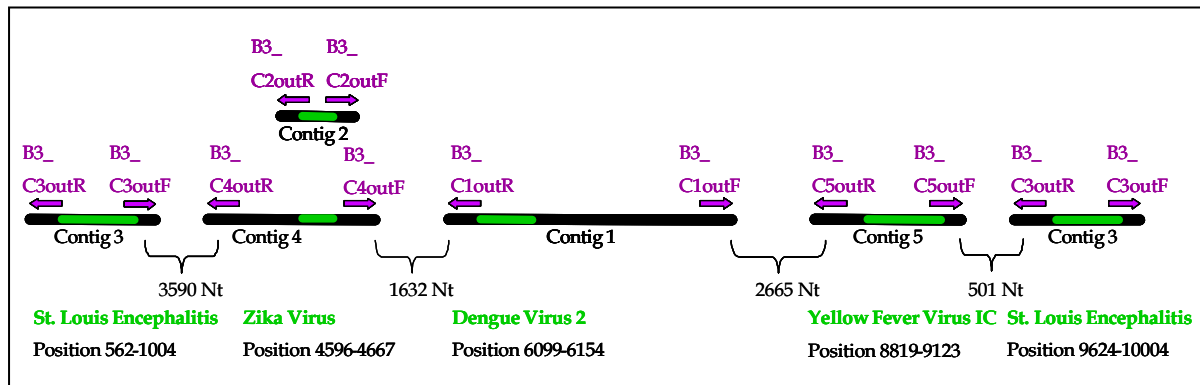


Abb. 4.9: Schematische Darstellung einer möglichen Anordnung der Contigs von Taï Forest Virus in Analogie zum Flavivirus-Genomaufbau. Die schwarzen Balken stellen die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzsegmente dar. Homologien zu anderen Flaviviren sind grün eingezeichnet. Die ausgewählten „out-Primer“ (lila) sollen in der PCR die fehlenden Sequenzen liefern und die einzelnen Contigs miteinander verbinden. Die Größen der fehlenden Genomfragmente wurden an Hand der Positionen der homologen Viren im Genom abgeschätzt. Da Contig 2 und 4 Homologien zur gleichen Genomposition von Zika Virus aufwiesen, sind sie übereinander dargestellt.

Für die PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) eingesetzt, um auch längere Genombereiche zwischen den einzelnen Segmenten zu überbrücken. In einer ersten PCR wurde versucht, die Anordnung von Contig 2 und 4 zu bestimmen (B3_C2outF/B3_C4outR und B3_C4outF/B3_C2outR) und diese beiden Contigs mit Contig 1 zu verbinden (B3_C4outF/B3_C1outR und B3_C2outF/B3_C1outR), sowie Contig 1 mit Contig 5 (B3_C1outF/B3_C5outR) und Contig 5 mit Contig 3 (B3_C5outF/B3_C3outR). Die ersten beiden Ansätze lieferten kein klares PCR-Produkt, sondern einen Schmier von Banden auf dem Agarosegel (Abb. 4.10, Spur 2 und 3).

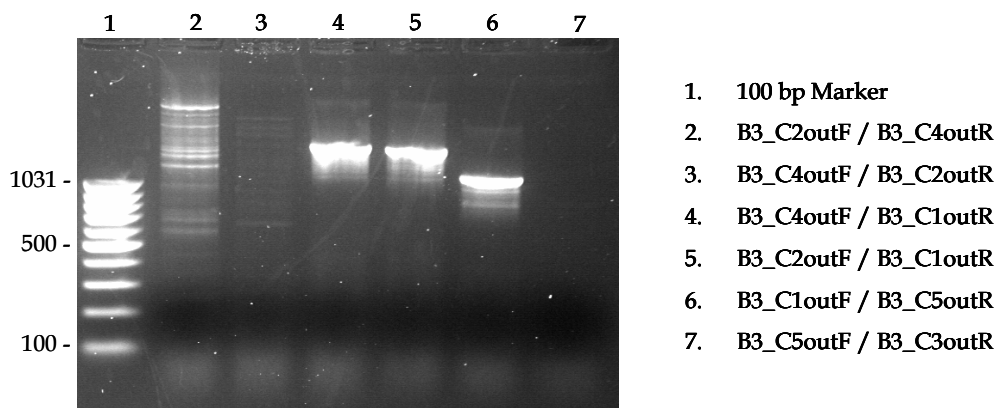


Abb. 4.10: Agarose-Gel der PCR-Produkte mit B3_out-Primern (Tab. 3.2) zur Verbindung der Contigs 1 bis 5. RNA wurde aus Überstand infizierter C6/36 Zellen extrahiert und cDNA mit Random Primern synthetisiert. Die cDNA wurde in der PCR mit verschiedenen Primerkombinationen getestet.

Die „out-Primer“ von Contig 5 und Contig 3 lieferten ebenfalls kein PCR-Produkt (Abb. 4.10, Spur 7). Die Ansätze vier (B3_C4outF/B3_C1outR) und fünf (B3_C2outF/B3_C1outR) führten jeweils zu PCR-Produkten von ca. 1500 bp (Abb. 4.10, Spur 4 und 5) und Ansatz sechs (B3_C1outF/B3_C5outR) zu einem PCR-Produkt von etwas mehr als 1000 bp (Abb. 4.10, Spur 6). Die Sequenzierung der Amplifikate ergab Sequenzen in der Länge von 1552 bp und 1042 bp, welche die Contigs 2, 1 und 5 miteinander verbanden. Die so zusammengesetzte Sequenz hatte eine Länge von 4914 bp und wird im Folgenden als Contig 215 bezeichnet.

Da die PCR mit den Primern B3_C5outF/B3_C3outR negativ war, wurde sie wiederholt und auf dem Agarosegel zeigten sich Banden verschiedener Größe, wobei zwei Produkte, eins mit 900 bp und eins mit 480 bp, scharfe Banden lieferten (nicht dargestellt). Diese wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und sequenziert. Der Vergleich mit der Sequenz Datenbank ergab, dass es sich bei den Produkten um amplifizierte Genome der Wirtszelle handelte.

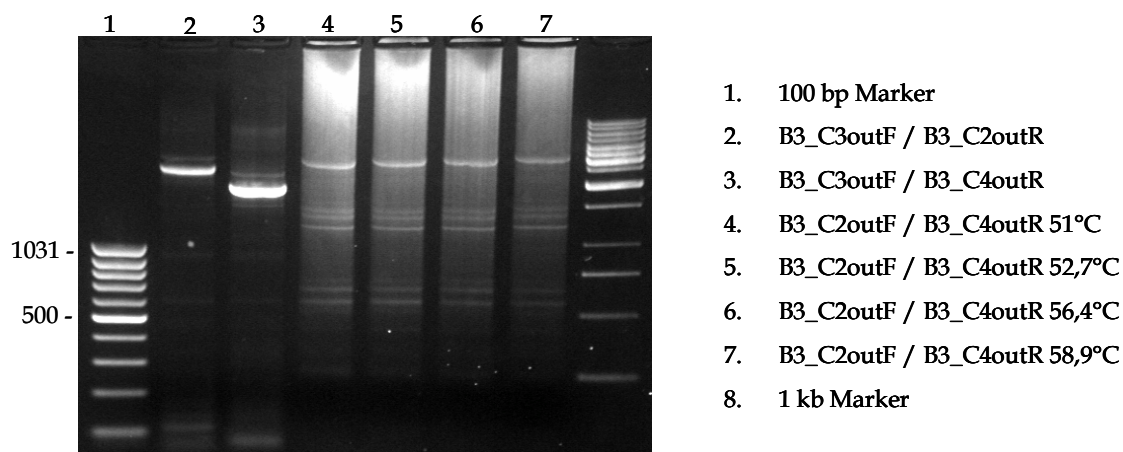


Abb. 4.11: Dargestellt sind die PCR-Produkte einer mit B3_out Primern (Tab. 3.2) durchgeführten PCR zur Verbindung des Contigs 3 mit Contig 2 und Contig 4 und die Optimierung der Annealing-Temperatur für die Primer B3_C2outF und B3_C4outR auf einem 1,5%igen Agarosegel. RNA wurde aus Überstand infizierter C6/36 Zellen extrahiert, cDNA mit Random Hexamer Primern synthetisiert und in der PCR eingesetzt.

Da Contig 3 neben der Homologie zur Genomposition 9624-10004 von SLEV auch Homologien zu den Nukleotiden 562-1004 dieses Virusgenoms zeigte, ist auch eine Position am 5'-Ende möglich (Abb. 4.9). Dies sollte in der folgenden PCR überprüft werden. Der B3_C3outF Primer wurde mit den reversen Primern B3_C2outR und mit B3_C4outR kombiniert. Zusätzlich wurden die Primer B3_C2outF/B3_C4outR in PCR-Reaktionen in einem Gradientenzukler mit verschiedenen Annealing-Temperaturen eingesetzt, da die Vielzahl an Banden in der ersten PCR möglicherweise durch eine nicht optimale Annealing-

Temperatur entstanden ist.

Mit den Primern B3_C3outF und B3_C2outR konnte ein Produkt in der Größe von ca. 3 kb und mit den Primern B3_C3outF und B3_C4outR in der Größe von ca. 1,9 kb amplifiziert werden (Abb. 4.11, Spur 2 und 3). Die Sequenzierung des B3_C3outF/B3_C2outR-Produkts lieferte zwei kurze überlagerte Sequenzfragmente, die nicht ausgewertet werden konnten. Die Sequenzierung des B3_C3outF/B3_C4outR-Produkts ergab eine Sequenz mit der Länge von 1868 bp, die allerdings an keins der bisher sequenzierten Fragmente anschloss, sondern ein eigenes Contig im Alignment bildete (Contig 12). Beim Vergleich mit der Datenbank (NCBI) zeigte sich auch hier Verwandtschaft zu Flaviviren.

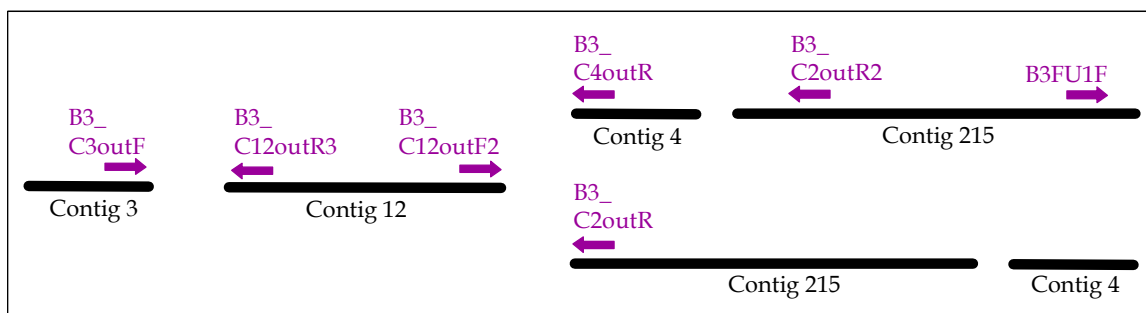


Abb. 4.12: Mögliche Reihenfolge der erhaltenen Contigs des aus Pool B3 isolierten Erregers.

An Hand der vorliegenden Ergebnisse wird die folgende Reihenfolge der ermittelten Sequenzen auf dem Genom postuliert: Contig 3, Contig 12, Contig 4, Contig 215, bzw. Contig 215 Contig 4 (Abb. 4.12). Um Contig 12 mit den anderen Contigs zu verbinden, wurden spezifische out-Primer synthetisiert (Tab. 3.2) und in der PCR eingesetzt (B3_C12outF2/B3_C4outR; B3_C12outF2/B3_C2outR; B3_C3outF/B3_C12outR3; B3_C3outF/B3_C4outR). Die Kombination der Primer B3_C12outF2/B3_C4outR lieferte ein PCR-Produkt von ca. 300 bp und die der Primer B3_C12outF2/B3_C2outR ein PCR-Produkt von ca. 900 bp (Abb. 4.13, Spur 2 und 3). Nach Sequenzierung der PCR-Produkte war es möglich Contig 12 mit Contig 4 zu verbinden (2871 bp). Die Versuche Contig 3 mit einem anderen Sequenzfragment zu verbinden führten trotz wiederholter Versuche zu keinem Ergebnis. Der Primer B3_C2outR (Abb. 4.13, Spur 3) lieferte eine Sequenz, die homolog zu einem Abschnitt auf Contig 12 ist. Möglicherweise handelt es sich hier um einen repetitiven Genomabschnitt. Aus diesem Grund wurde ein neuer Primer ausgewählt, der noch vor der repetitiven Sequenz liegt (B3_C2outR2) und mit B3_C12outF2 (Tab. 3.2) in der PCR eingesetzt. Dies führte zu einem PCR-Produkt von 1200 bp (nicht gezeigt), welches nach Sequenzierung Contig 215 und 12 miteinander verbunden hat und somit ein insgesamt 7256 bp großes Fragment lieferte.

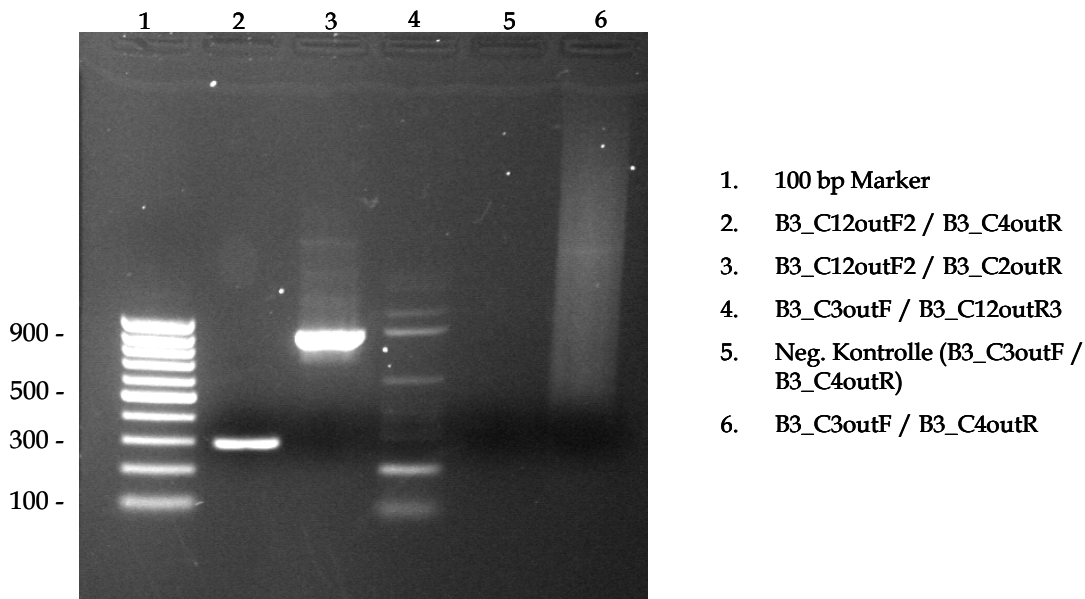


Abb. 4.13: Auftrennung der PCR-Produkte einer mit B3_out Primern durchgeführten PCR, die Contig 12 mit den anderen Contigs verbinden sollte auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel. RNA wurde aus Überstand infizierter C6/36 Zellen extrahiert und cDNA mit Random Primern synthetisiert.

Flaviviren besitzen am 3'-Ende im NS5-Gen homologe Sequenzabschnitte, auf die in einer Studie zur phylogenetischen Einordnung von Flaviviren Primer gelegt wurden (sense FU1, antisense cFD3R und VD8R, Kuno *et al.*, 1998). Der Forward Primer wurde in den vorliegenden Untersuchungen neu definiert, da im Bindungsbereich dieses Primers zwei Nukleotide im vorliegenden Genom verändert waren (B3FU1F, Abb. 4.12, Tab. 3.2).

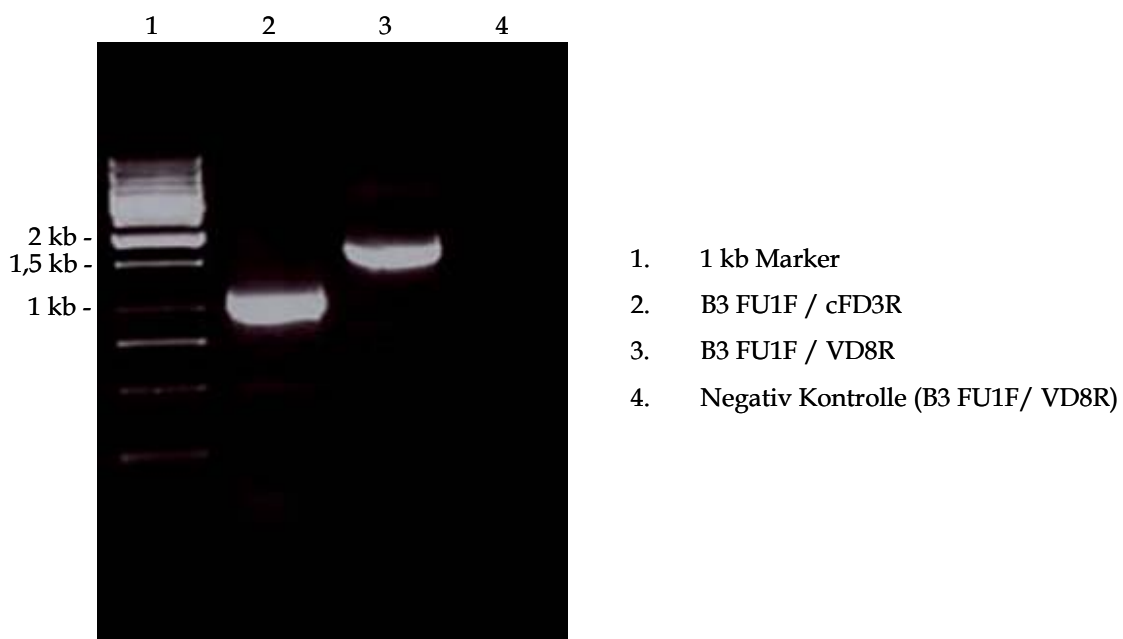


Abb. 4.14: Auftrennung der PCR-Produkte der NS5-Region von Tai Forest Virus auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel. RNA wurde aus Überstand infizierter C6/36 Zellen extrahiert und cDNA mit Random Hexamer Primern synthetisiert. Die cDNA wurde in eine PCR mit den Primern B3 FU1F/ cFD3R und in einem zweiten Ansatz mit den Primern B3 FU1F/ VD8R eingesetzt.

Die PCR mit den Primern B3FU1/cFD3R und B3FU1/VD8R ergab Amplifikate in der Größe von 1 kb und 1,5 kb (Abb. 4.14, Spur 2 und 3), welche die für TFV ermittelte nach Sequenz auf 8775 bp verlängerten (Accession number EU159426). Dabei stellte sich heraus, dass Contig 3 zu einem Teil der verlängerten Sequenz homolog ist und sich somit am 3'-Ende des Genoms befindet. Eine erneute Sequenzanalyse der verlängerten Sequenz mit der NCBI-Datenbank erbrachte zu den in Tab. 4.4 aufgeführten Homologien vergleichbare Verwandtschaft zu anderen Flaviviren (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Sequenzanalyse des 8775 bp Genomfragments von TFV B3.

Verwandtschaft auf Nukleinsäureebene	Verwandtschaft auf Aminosäureebene
West-Nil Virus strain 96-111	Zika Virus (1578/2355, 67%) ^b , 664-2987 ^c
5419-5459: 38/41 (92%) ^a	Bussuquara Virus (1559/2352, 66%) ^b , 667-2994 ^c
8989-9110: 100/123 (81%) ^a	Rocio Virus (1565/2363, 66%) ^b , 660-2992 ^c
9971-10096: 107/126 (84%) ^a	Murray-Valley-Enzephalitis Virus
10756-10780: 25/25 (100%) ^a	(1543/2358, 65%) ^b , 667-3001 ^c
10827-10854: 27/28 (96%) ^a	Usutu Virus (1548/2357, 65%) ^b , 667-2984 ^c
St.-Louis-Enzephalitis Virus Isolat MSI-7 from USA	West-Nil Virus (1558/2355, 66%) ^b , 661-2997 ^c
5776-5826: 46/51 (90%) ^a	St.-Louis-Enzephalitis Virus (1537/2360, 65%) ^b ,
9070-9119: 43/50 (86%) ^a	669-2996 ^c
9985-10089: 91/105 (86%) ^a	
Entebbe-Bat Virus strain UgIL-30	
8988-9118: 107/132 (81%) ^a	
9945-10060: 99/116 (85%) ^a	
10427-10449: 23/23 (100%) ^a	

^a Anzahl gleicher Nukleotide; ^b Anzahl gleicher Aminosäuren; ^c Position innerhalb des Genoms

4.6.1.2.3 Weitere Charakterisierung des Virusgenoms

Zur weiteren Untersuchung des Taï Forest Virus war die Charakterisierung des Virusgenoms von grundlegender Bedeutung. An Hand der Homologien zu verschiedenen Flaviviren und der Darstellung der Morphologie des Viruspartikels in der Elektronenmikroskopie kann TFV zu den Flaviviren gruppiert werden. Da Flaviviren RNA-Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom in positiv Orientierung sind, sollte das Genom des vorliegenden Virusisolats auch auf diese Eigenschaft untersucht werden.

Um eine Aussage über die Art und Größe des Virusgenoms treffen zu können, wurden je 2 µg unter RNase-freien Bedingungen extrahierte Nukleinsäure mit RNase und in einem weiteren Ansatz mit DNase verdaut und dann elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel 60-90 min bei 60 V aufgetrennt. Zur Schonung der RNA wurden die Gele erst im Anschluss an die Auftrennung gefärbt. Bei der Auswertung des Gels waren jedoch in keinem Ansatz Banden sichtbar (Abb.4.27). Auch in wiederholten Ansätzen konnten keinen Banden dargestellt werden.

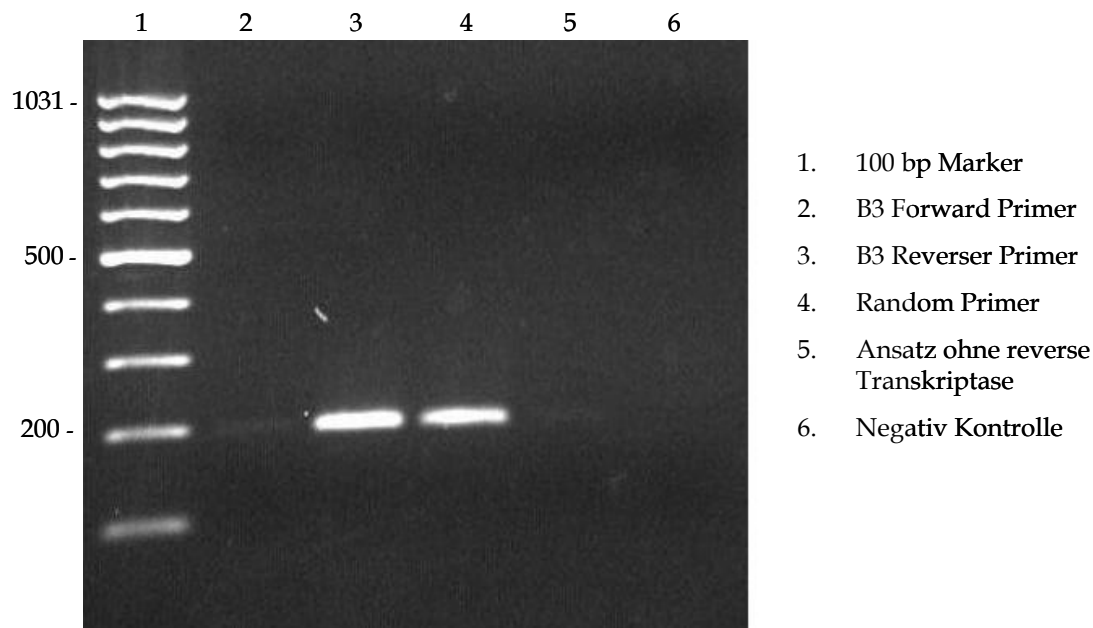


Abb. 4.15: Nachweis der Nukleinsäure auf einem 2 %igen Agarosegel. Der Überstand der infizierten Zellkultur wurde vor Aufschluss der Virionen und der Nukleinsäureextraktion mit RNase und DNase behandelt. Spezifische cDNA wurde mit dem B3 Forward und dem B3 Reversen Primer synthetisiert. In An- und Abwesenheit von reverser Transkriptase wurde cDNA mit Random Primern synthetisiert mit anschließender Amplifikation mit spezifischen Primern.

In einem weiteren Versuch wurde virushaltiger Zellkulturüberstand mit RNase und DNase behandelt. Virale mRNAs aus infizierten Zellen, die bei der Zellyse freigesetzt werden können, sollten vor dem Aufschluss der Viruspartikel verdaut werden, um eine Verwechslung mit genomischen Sequenzen zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine RNA-Extraktion mit Tri-Reagent®. Die cDNA-Synthese erfolgte in An- und Abwesenheit von reverser Transkriptase mit Random Primern und als Vergleich mit für dieses Isolat spezifischen Primern in entgegengesetzter Orientierung (Position B3F nt = 2809-2831, B3R nt = 2999-2979, Tab. 3.2). Mit diesen vier Ansätzen wurde anschließend eine konventionelle PCR mit den für dieses Isolat spezifischen Primern B3F und B3R durchgeführt. Das erwartete Amplifikat hat eine Größe von 190 bp. Nach der PCR wurden die Proben in einer Elektrophorese auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert.

Der Ansatz mit den Random Primern und reverser Transkriptase zeigte das erwartete Produkt von 190 bp (Abb. 4.15, Spur 4). Der Ansatz ohne reverse Transkriptase hingegen lieferte kein PCR-Produkt (Abb. 4.15, Spur 5), woraus sich schließen lässt, dass es sich um ein Virus mit einem RNA-Genom handelt. Die Ansätze mit den spezifischen Primern B3F und B3R führten nur im Fall von B3R zu dem Amplifikat (Abb. 4.15, Spur 3). Dennoch führte nur die cDNA-Synthese Reaktion mit dem B3R Primer zu einer cDNA, d.h. das RNA Genom von TSV muss in positiver Strangorientierung vorliegen, wie es für Flaviviren zu erwarten war.

4.6.1.2.4 Etablierung einer quantitativen Real-Time PCR (Standardreihen Taq Man)

Um einen quantitativen Genomnachweis für das Virusisolat Tai Forest Virus zu etablieren, wurde ein Plasmid zur Standardisierung der Genomäquivalente angefertigt.

Hierfür wurde durch die PCR mit den Primern B3F und B3R ein spezifisches Amplifikat von 190 bp aus virushaltigem Zellkulturüberstand amplifiziert und in den pCR2.1 Vektor (3908 bp) kloniert. Die Klone wurden mittels Kolonien-PCR auf das Insert geprüft, von einem positiven Klon eine Plasmidpräparation durchgeführt (3.17) und die Kopienzahl des Plasmids errechnet (3.18). Zusätzlich wurde eine sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonde ausgewählt, um in der quantitativen *Real-Time* PCR die Anzahl der in der Probe enthaltenen cDNA-Kopien ermitteln zu können (Tab. 3.2).

Die Menge an Plasmid betrug 562,5 ng/μl und es wurde daraus eine Konzentration von 12,5 * 10¹⁰ Kopien/μl errechnet. Es wurde eine Plasmidlösung mit einer Konzentration von 1x10¹⁰ Kopien/μl aus 8 μl Plasmid zur besseren Konservierung des Plasmids in 92 μl λ-DNA (Konzentration von 1 ng/μl) hergestellt. Ausgehend von dieser Konzentration wurde durch serielle Verdünnung in λ-DNA eine Standardreihe von 10¹⁰ bis 10¹ Kopien/μl angefertigt und diese in den Verdünnungsstufen von 10⁶ bis 10¹ Kopien/μl in der quantitativen *Real-Time* PCR eingesetzt (Abb. 4.16).

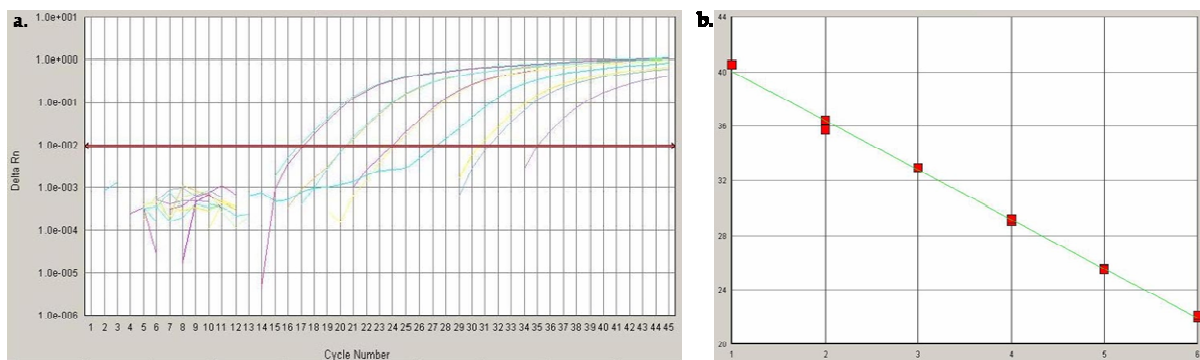


Abb. 4.16: Etablierung einer für TFV spezifischen *Real-Time* PCR. Gezeigt ist die quantitative *Real-Time* PCR bei der 2 μl des Plasmidstandards in den Verdünnungsstufen von 10⁶ bis 10¹ Kopien/μl in einer Doppelbestimmung aufgetragen wurden. a. Amplifikationskurven der Plasmidstandards in den Konzentrationen von 10⁶ bis 10¹ Kopien/μl, b. Ableitung der Standardkurven zur Bestimmung der Effizienz.

4.6.1.2.5 Erregerprävalenz in den verschiedenen Zonen

Um die Verbreitung von Tai Forest Virus zu bestimmen, wurden, mit Hilfe der für TFV spezifischen *Real-Time* PCR alle Zellkulturen aus den Anzuchtversuchen, die einen CPE gezeigt haben, auf dieses Virus untersucht.

Aus Zellkulturüberstand von infizierten Zellen wurde RNA extrahiert, cDNA hergestellt

(3.10.2, 3.11) und davon 2 µl in die *Real-Time* PCR eingesetzt. Die Proben aus den einzelnen Zonen wurden in getrennten Läufen getestet, um Kontaminationen zwischen den Zonen zu vermeiden.

Als einzige zusätzliche positive Probe mit $8,9 \times 10^6$ Kopien /ml wurde Zellkulturüberstand des Pools B31 aus dem Primärwald identifiziert, welcher ebenfalls Moskitos der Art *Uranotaenia mashoensis* enthält, die allerdings in 24 m Höhe über dem Waldboden gefangen wurden.

4.6.1.2.6 Phylogenetische Einordnung

Durch eine phylogenetische Stammbaumanalyse sollte die Verwandtschaft der Virusisolate aus den beiden Pools B3 und B31 untereinander und zu anderen Flaviviren untersucht werden.

Zunächst wurde mit Zellkulturüberstand von mit Pool B31 infizierten Zellen eine PCR mit den Primern B3FU1/cFD3R und B3FU1/VD8R durchgeführt und auf einem Agarosegel analysiert. Die Amplifikate mit den erwarteten Größen von 1 kb und 1,5 kb wurden aufgereinigt und sequenziert (Accession number EU159427). Das Sequenzfragment des Virusisolats aus Pool B31 war 1711 bp lang und zeigte 97 % (1665/1711 Nukleotide) Übereinstimmung zu TFV B3 und wird folglich als Tai Forest Virus B31 (TFV B31) bezeichnet. Der Vergleich mit bekannten Sequenzen der Datenbank zeigte für Teilsequenzen von TFV B31 wie schon für das Isolat TFV B3 sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene zu verschiedenen Flaviviren (Tab.4.7). Die gefundenen Homologien von TFV B31 zu verschiedenen Flaviviren waren zu denen von TFV B3 vergleichbar.

Tab. 4.7: Ergebnis des Sequenzvergleichs der NS5-Region des Virus aus Pool B31 mit publizierten Sequenzen der Datenbank auf Nukleotid- und Aminosäureebene.

Nukleotidebene	Aminosäureebene
Dengue Virus Typ 2 strain ThD2_0078_01	St.-Louis-Enzephalitis Virus
118/140 (84%) ^a , 8923-9062 ^b ;	292/450 (64%) ^c , 2980-3429 ^b
27/27 (100%) ^a , 10576-10602 ^b ;	Bagaza Virus
44/48 (91%) ^a , 9976-10022 ^b ;	295/444 (66%) ^c , 2977-3420 ^b
Gelbfieber Virus 17D Brazil	Japanisches-Enzephalitis Virus
70/77 (90%) ^a , 10025-10101 ^b ;	295/439 (67%) ^c , 2983-3421 ^b
36/41 (87%) ^a , 9041-9081 ^b	

^a Anzahl gleicher Nukleotide; ^b Position innerhalb des Genoms; ^c Anzahl gleicher Aminosäuren

Zum einen wurde ein Stammbaum auf Nukleotidebene erstellt und zum anderen auf Aminosäureebene, da das Austauschen von einzelnen Nukleotiden nicht zwangsläufig zu einer Änderung der Aminosäuresequenz und damit des Proteins führt. Zur

phylogenetischen Analyse wurden die Sequenzen der NS5-Region von TFV B3 und TFV B31 und repräsentative Viren des Genus *Flavivirus* in Bio Edit eingeladen, editiert und ein Alignment hergestellt. Der Stammbaum wurde mit dem PHYLIP 3.572 Package erstellt. Zunächst wurde eine Distanzmatrix und anschließend ein phylogenetischer Stammbaum mit dem *Neighbour-Joining*-Verfahren erstellt. Um die Signifikanz der Verzweigungspunkte im Stammbaum zu überprüfen, wurde eine *bootstrap*-Analyse mit 1000 Wiederholungen durchgeführt (Thompson *et al.*, 1994).

Im Nukleotid-Stammbaum zeigt sich, dass die beiden Isolate sehr eng miteinander verwandt sind. Sie ordnen sich zwar in die Gruppe der Flaviviren, die durch Moskitos übertragen werden ein, zeigen aber eine deutliche phylogenetische Distanz zu den bekannten durch Moskitos übertragbaren Flaviviren (Abb. 4.17). Der *bootstrap*-Wert für die Verzweigung der durch Moskitos übertragenen Flaviviren wurde mit 99,8% berechnet und ist damit hochgradig signifikant. Es ist sehr wahrscheinlich, dass beide Isolate in diesen Genus der Flaviviren eingeordnet werden können. Nähere Verwandtschaft zu anderen Mitgliedern der Familie der Flaviviren konnte nicht festgestellt werden. Die Virusisolate TFV B3 und B31 unterscheiden sich nur geringfügig voneinander und zeigen einen *bootstrap*-Wert von 100% an.

Im Aminosäure-Stammbaum stehen die Isolate TFV B3 und B31 ebenfalls sehr eng zusammen und gliedern sich in den Genus *Flavivirus* ein, der durch Moskitos übertragen wird (Abb. 4.18). In dieser Analyse bilden beide Isolate eine eigene Gruppe und zeigen eine deutliche genetische Distanz zu anderen Flaviviren. Die Isolate spalten sich in diesem Stammbaum mit den Dengue Viren (DENV) ab und nicht wie im Nukleotidstammbaum von Gelbfiebereviren (YFV). Allerdings sind in beiden Fällen die *bootstrap*-Werte für die Anordnung von TFV B3 und B31 innerhalb des Genus *Flavivirus* so gering, dass hierzu keine genaue Aussage gemacht werden kann.

Mit der phylogenetischen Stammbaum-Analyse konnten die Isolate TFV B3 und B31 sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene in die Gruppe der Flaviviren, die durch Moskitos übertragen werden, eingeordnet werden. Vermutlich bilden die TFV Isolate aber eine neue Gruppe innerhalb der *Flaviviridae*.

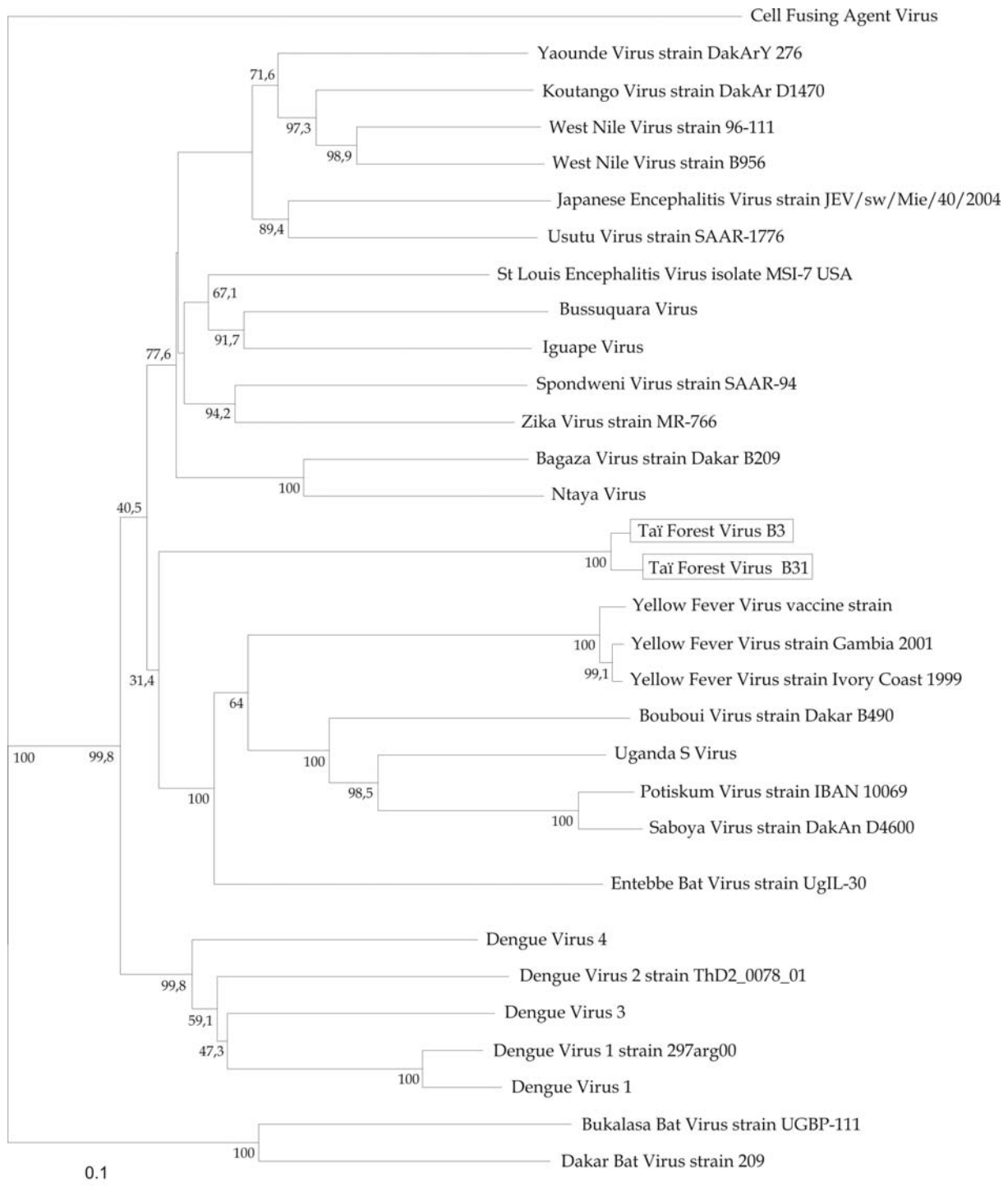


Abb. 4.17: Phylogenetische Analyse der Nukleotidsequenz der NS5-Region von verschiedenen Flavivirus-Isolaten mit der NJ-Methode.

Ein 1099 bp langes NS5-Fragment von TFV B3 und B31 wurde zur Analyse mit der NJ-Methode eingesetzt und ein phylogenetischer Baum erstellt. Es wurde eine *bootstrap*-Analyse mit 1000 Replikaten durchgeführt. Der Distanzbalken mit dem Wert 0,1 zeigt die Länge an, die 10 % Nukleotidaustausch pro Position im Sequenzalignment entspricht. Die *bootstrap*-Werte für die Verzweigungspunkte sind in Prozent angegeben. Als Außengruppe wurde das Cell Fusing Agent Virus (CFAV) verwendet. Die in dieser Arbeit neu beschriebenen Sequenzen sind durch eine Box markiert.

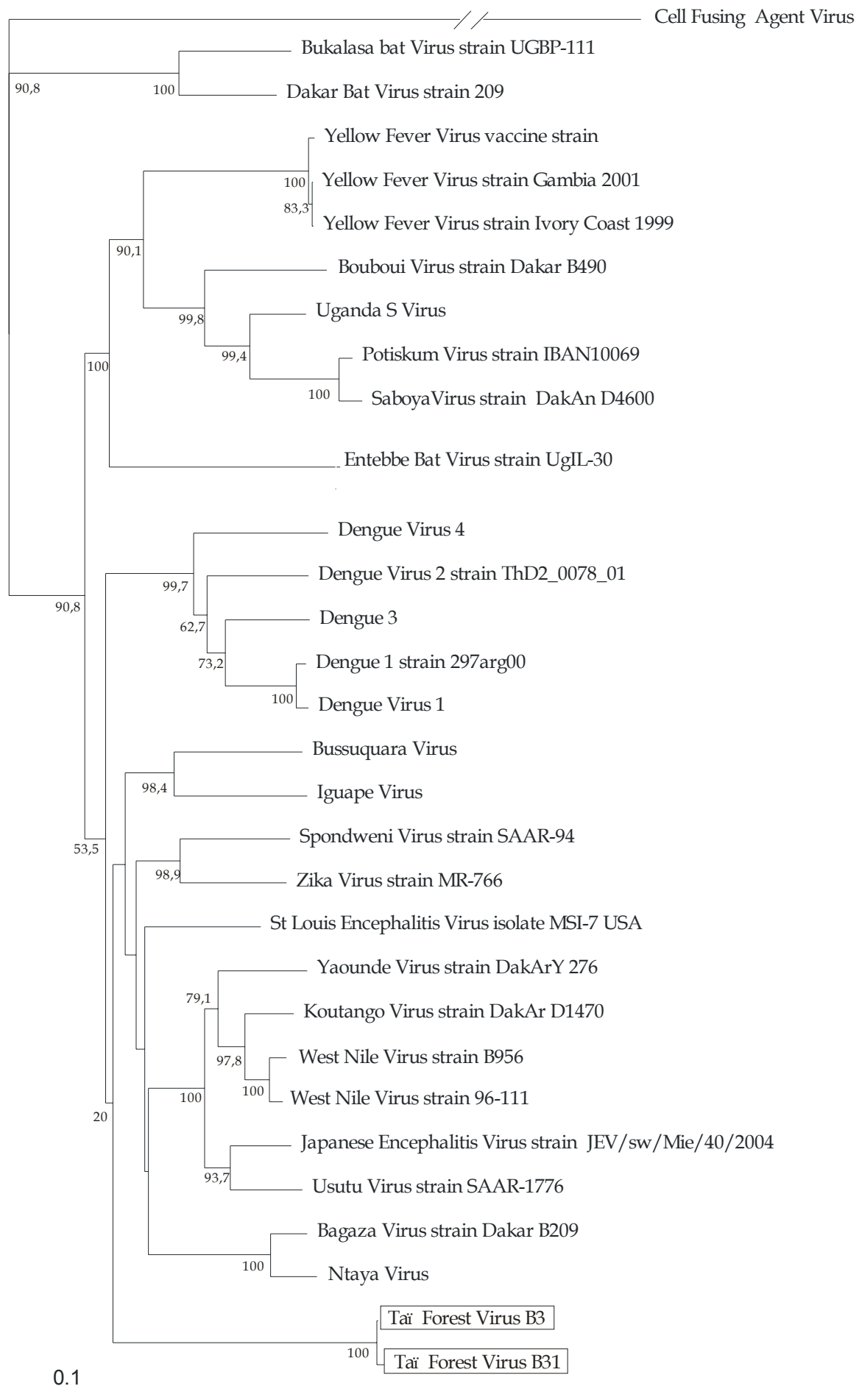


Abb. 4.18: Phylogenetische Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der NS5-Region von verschiedenen Flavivirus-Isolaten mit der NJ-Methode.

Ein 329 AS langes Fragment der NS5-Region von TFV B3 und B31 wurde zur Analyse mit der NJ-Methode eingesetzt und ein phylogenetischer Baum erstellt. Es wurde eine *bootstrap*-Analyse mit 1000 Replikaten durchgeführt. Der Distanzbalken mit dem Wert 0,1 zeigt die Länge an, die 10 % Aminosäureaustausch pro Position im Sequenzalignment entspricht. Die *bootstrap*-Werte für die Verzweigungspunkte sind in Prozent angegeben. Als Außengruppe wurde das Cell Fusing Agent Virus (CFAV) verwendet. Die in dieser Arbeit neu beschriebenen Sequenzen sind durch eine Box markiert.

Zusammenfassend wurde bei der Charakterisierung des Virusisolats TFV B3 gezeigt, dass ein behülltes Virus mit einem einzelsträngigen RNA-Genom in positiver Strangorientierung vorliegt, welches auf C6/36 Zellen repliziert. Die Virusreplikation erfolgt im Cytoplasma der Zelle. Die Virionen haben eine Größe zwischen 50 und 60 nm und besitzen die Morphologie von Flaviviren. Es konnten insgesamt 8775 bp des Virusgenoms sequenziert werden. Ein weiteres Isolat TFV B31 wies 97 % Homologie zu dem Isolat TFV B3 auf. In einem phylogentischen Stammbaum clustern beide Viren mit Mitgliedern des Genus Flavivirus. Allerdings zeigen diese zu keinem bekannten Flavivirus nähere Verwandtschaft, so dass von einer neuen Gruppe innerhalb des Genus Flavivirus ausgegangen werden kann. Das neue Virus wird als Tai Forest Virus (TFV) bezeichnet.

4.6.2 Untersuchungen des Pools F23

Das Homogenat aus Pool F23 führt auf C6/36 Zellen zu einem CPE. Der Überstand der infizierten Zellkulturen wurde in der quantitativen *Real-Time* PCR negativ für verschiedene Flaviviren getestet. Jedoch konnten aus dem Überstand im Elektronenmikroskop Bunyavirus-ähnliche Partikel dargestellt werden. Im Folgenden soll das Virus molekulargenetisch und virologisch näher charakterisiert werden.

4.6.2.1 Molekulargenetische Untersuchungen

4.6.2.1.1 Amplifikation von viralen Genomfragmenten

Zunächst sollten Sequenzinformationen von diesem Virus generiert werden, um das Isolat im Vergleich mit bekannten Virusgenomsequenzen einordnen zu können. Dazu wurde die bereits unter 3.20 beschriebene Methode angewendet (Stang *et al.*, 2005).

Insgesamt wurden 125 verschiedene Klone sequenziert (Abb. 4.19) und in der Datenbank nach Homologien gesucht (Tab. 4.8; Sequenzen Sequenzen können auf Wunsch angefordert werden). 26 der sequenzierten Klone enthielten Amplifikate die Homologien zum Genom

der C6/36 Zellen und 11 Klone zeigten Homologien zu Mycoplasma Stämmen, so dass von einer Infektion der Zellkultur aus der der virushaltige Überstand aufgereinigt worden ist, auch mit Mycoplasmen auszugehen ist. Ein Klon beinhaltete nur die Vektorsequenz ohne Insert. 16 Klone zeigten zu keiner der in der Datenbank vorhandenen Sequenzen Homologien, weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäureebene. Bei vier Klonen konnten auf Aminosäureebene geringe Homologien über sehr kurze Sequenzblöcke zu Dengue Virus Typ 3 und bei einem Klon zu Snow Shoe Hare Virus gefunden werden. Da diese Homologien sehr gering waren und nicht mit den Ergebnissen aus der Elektronenmikroskopie übereinstimmten, wurden sie nicht weiter verfolgt. Von den restlichen 67 Sequenzfragmenten überlappten einige und ließen sich zu längeren Contigs zusammenschließen. So bestand Contig 2 z.B. aus den Klonen 1, 6, 25, 48, 54 und 114 (Tab. 4.8). Homologien zu anderen Sequenzen zeigten sich nur auf Aminosäureebene und zwar zu zwei verschiedenen Genera von Bunyaviren. Bunyaviren besitzen ein segmentiertes Genom (Segmente L, M und S, von large, medium und small). Das L-Segment codiert für die RNA-Polymerase, das M-Segment für die viralen Glykoproteine und das S-Segment für das Nukleokapsid. Zu allen drei Segmenten wurden Homologien gefunden.

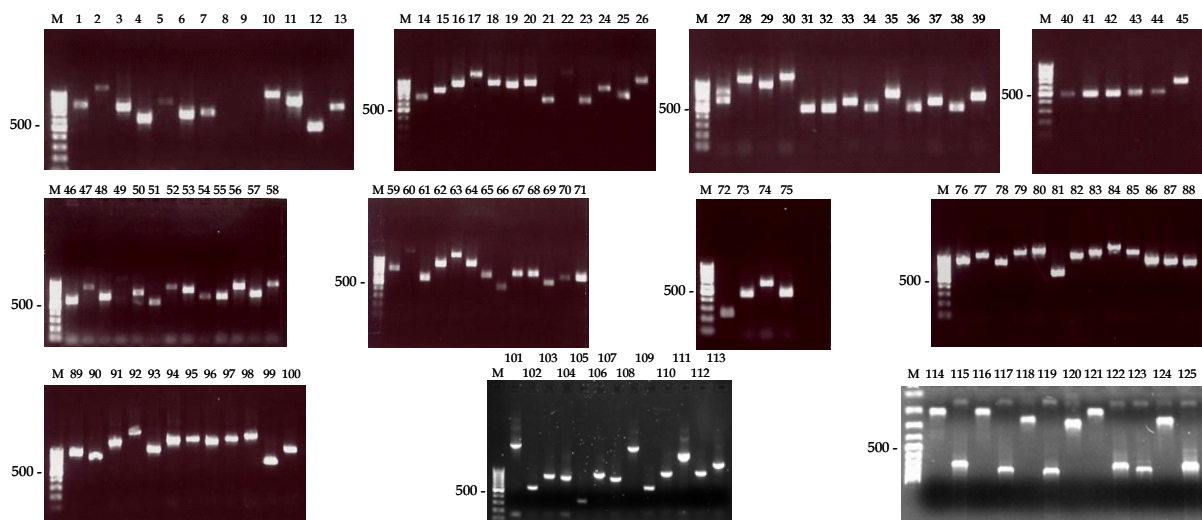


Abb. 4.19: Dargestellt sind die Klone der Random-Amplifikate des Pools F23 nach der Kolonien-PCR auf einem 1,5%igen Agarosegel. Als Molekulargewichts-Standard diente ein 100 bp-Marker, welcher zur Orientierung bei 500 bp eine Bande stärkerer Intensität aufweist. Überstand von infizierter Zellkultur wurde gereinigt und aufkonzentriert, RNA extrahiert und mit Random Primern, die eine Ankersequenz besitzen, cDNA synthetisiert. In der PCR erfolgte eine Amplifikation mit für die Ankersequenz spezifischen Primern. Die PCR-Produkte wurden in einen Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Die untersuchten Klone sind durchnummeriert (s. auch Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Vergleich von Contigs des Virusisolats aus Pool F23 nach der mit Random Primern durchgeführten Amplifikation und Sequenzierung der Fragmente mit der öffentlichen Datenbank. Nicht aufgeführt sind Sequenzen, die Homologien zu C6/36 Zellen und zu Mycoplasmen aufwiesen.

Contig	Klon	Länge (bp)	Verwandtschaft Aminosäureebene
Homologien zum L-Segment:			
2	1, 6, 25, 48, 54, 114	1387	RNA Polymerase RVFV (1373-1430, 44%) ^a ; RNA Polymerase Uukuniemi Virus (1074-1206, 32%,) ^a ; RNA Polymerase RVFV (1070-1201, 33%) ^a RNA Polymerase RVFV (1579-1724, 26%) ^a
9	16, 18, 26, 29 53	801	
10	52	715	RNA Polymerase La-Crosse Virus (781-869, 31%) ^a ; RNA Polymerase Oropouche Virus (777-876, 30%) ^a ; Bunyamwera unnamed protein product (788-944, 27%) ^a ;
11	66	133	RNA Polymerase La-Crosse Virus (781-869, 31%) ^a ; RNA Polymerase Oropouche Virus (777-876, 30%) ^a Bunyamwera unnamed protein product (788-944, 27%) ^a ;
16	4	560	RNA Polymerase Oropouche Virus (494-555, 33%) ^a ; RNA Polymerase La-Crosse Virus (493-559, 32%) ^a ; Bunyamwera unnamed protein product (499-568, 28%) ^a
17	7	653	RNA Polymerase Sandfly-Fever Virus (782-883, 35%) ^a
20	24	704	RNA Polymerase Sandfly-Fever Virus (589-716, 39%) ^a ; RNA Polymerase Uukuniemi Virus (597-717, 39%) ^a
Homologien zum S-Segment:			
4	19, 56, 62, 64	609	Nucleocapsid Sandfly-Fever Virus (25-154, 31 %) ^a
23	2	665	Nucleocapsidprotein Snowshoe Hare Virus (123-229, 23%) ^a
Homologien zum M-Segment:			
12	17, 63, 102	762	Glykoprotein Uukuniemi Virus (805-983 23%) ^a ; Glykoprotein G2 Uukuniemi Virus (292-470, 23%) ^a
Homologien zu anderen Viren :			
5	10, 11, 47, 55, 103	877	Dengue Virus 3 nonstructural Protein 1 (344-400, 83%) ^a
13	32, 34, 41	385	Dengue Virus 3 nonstructural Protein 1 (377-400, 79%) ^a
18	12	356	Dengue Virus 3 nonstructural Protein 1 (377-400, 79%) ^a
keine Homologien zu veröffentlichten Sequenzen :			
1	39, 45, 67, 68, 74	485	
3	33, 37, 70, 71,	420	
6	50, 101	580	
7	65	450	
8	57	540	
14	35	459	
15	21	430	
19	13, 28	1053	
21	3	534	
22	5	622	
24	125	225	
25	110	216	
26	86	677	
27	78	563	
28	105	374	
29	30, 58, 59	632	

^aGenomposition

Verwandtschaft zum L-Segment von Phleboviren wiesen Contig 2 und 9 auf, welche Übereinstimmungen von 44 %, bzw. 26 % zur RNA-Polymerase von Rift-Valley-Fever Virus zeigten und Contig 17 und 20, welche 35 %, bzw. 39 % Übereinstimmung zur RNA-Polymerase von Sandfly-Fever Virus zeigten. Contig 10 und 16 wiesen 27 % und 33 % Homologie zum L-Segment von Oropouche Virus und La-Crosse Virus auf, welche zu den Orthobunyaviren gehören. Übereinstimmung mit dem Nukleokapsidprotein (S-Segment) von Phleboviren zeigte Contig 4 (31 % mit Sandfly-Fever Virus) und zum M-Segment von Phleboviren zeigte Contig 12 Verwandtschaft (23 % mit Uukunemie Virus). Alle genannten Contigs waren zu unterschiedlichen Bereichen der Virusgenome homolog, außer Contig 10 und 17, welche zwar Homologien zur selben Genomposition, aber zu Viren unterschiedlicher Genera, aufwiesen.

Mit der Sequenzierung von Genombereichen des Virusisolats aus Pool F23 wurden zum einen Homologien zum Genus Phlebovirus und zum anderen zum Genus Orthobunyavirus, der Familie der *Bunyaviridae*, gefunden, wodurch die morphologische Einordnung der Viruspartikel in der Anzucht durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterstützt wurde. Die ermittelten Homologien sind allerdings mit ca. 30 % auf Aminosäureebene sehr gering. Die Verwandtschaft auf Aminosäureebene zu zwei verschiedenen Genera macht deutlich, wie problematisch die Einordnung von bisher unbekannten Bunyavirusisolaten sein kann.

4.6.2.1.2 Sequenzierung des Genoms

Ausgehend von den Homologien zur RNA-Polymerase verschiedener Bunyaviren, wurden die Contigs in eine mögliche Reihenfolge gebracht. Dabei teilten sich die Contigs aufgrund der Verwandtschaft zu Viren zweier verschiedener Genera in zwei Anordnungen auf (Abb. 4.20 a,b). Im Folgenden sollte versucht werden, die einzelnen Sequenzfragmente in der PCR miteinander zu verbinden. Dazu wurden Primer ausgewählt, die ausgehend von den verschiedenen Contigs nach außen zeigten. Zusätzlich wurden für jedes Fragment spezifische Primer (Tab. 3.2) verwendet, die zum einen für einen spezifischen Virusnachweis und zum anderen auch für die Verbindung der Contigs in der PCR eingesetzt werden konnten.

Die Primer vermutlich benachbarter Contigs wurden in der PCR eingesetzt und mittels Elektrophorese geprüft, ob Amplifikate entstanden sind. Die erhaltenen Fragmente, wurden sequenziert und mit der Lasergene SeqMan Software analysiert.

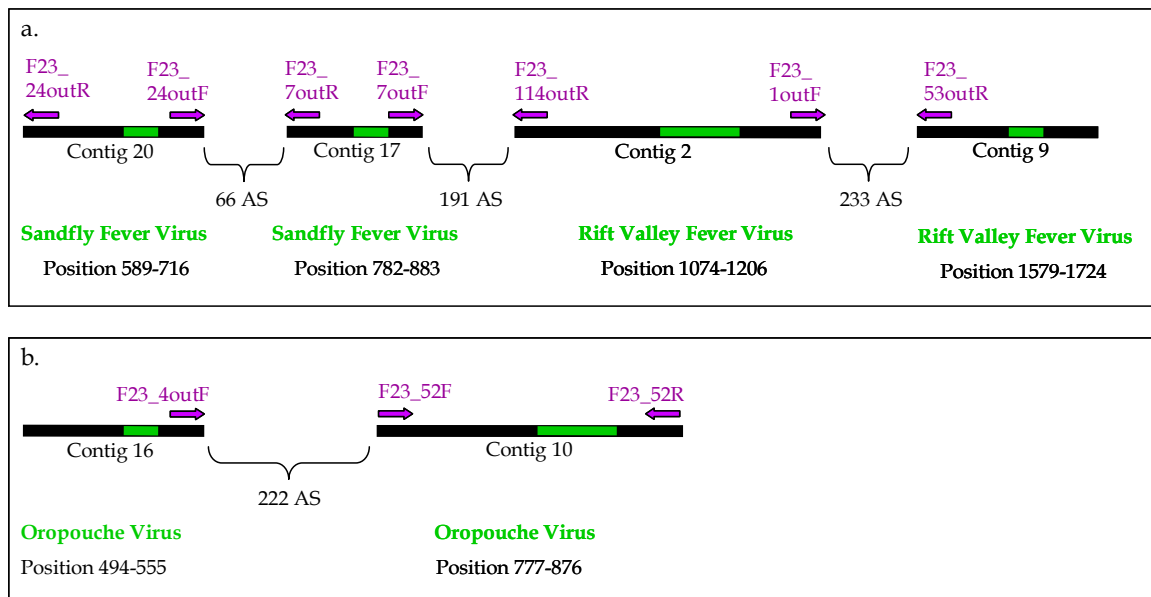


Abb. 4.20: Mögliche Anordnung der Sequenzsegmente aus Pool F23 nach ihrer Homologie zur RNA-Polymerase von Bunyaviren. Die schwarzen Balken stellen die isolierten Sequenzsegmente dar. Homologien zu anderen Bunyaviren sind grün eingezeichnet. Die ausgewählten „out-Primer“ (lila) sollen in der PCR die fehlenden Sequenzen amplifizieren und die einzelnen Contigs miteinander verbinden (Tab.3.2). Die Größen der fehlenden Genomfragmente wurden an Hand der Positionen der homologen Viren im Genom abgeschätzt. a. Homologien zur RNA-Polymerase von Phleboviren (Polymerasegen A), b. Homologien zur RNA-Polymerase von Orthobunyaviren (Polymerasegen B).

Die aus der Kombination der spezifischen und „out-Primer“ erhaltenen Sequenzen verbanden Contig 20, 17, 2 und 9 in der dargestellten Reihenfolge miteinander und lieferten ein Sequenzfragment von 3,579 kb (Accession number EF423167). Contig 16 und 10 lieferten ein 1,506 kb (Accession number EF423168) großes Fragment. Ein weiterer Vergleich dieser Sequenzen mit der Datenbank ergab keine neuen oder engeren Verwandtschaften als in Tab. 4.8 dargestellt. Versuche, diese beiden Polymerase-Fragmente, die im Folgenden mit Polymerasegen A und Polymerasegen B bezeichnet werden, miteinander zu verbinden, schlugen fehl. Da Polymerasegen A und Polymerasegen B Homologien zu zwei unterschiedlichen Genera der Bunyaviren aufwiesen und sich in der PCR nicht miteinander verbinden ließen, kann spekuliert werden, dass aus Pool F23 mindestens zwei verschiedene Viren angezüchtet werden konnten. Inwieweit es sich bei diesen Isolaten um Bunyaviren handelt, wie die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie und die wenn auch geringen Sequenzhomologien vermuten lassen, muss durch weitere Versuche geklärt werden.

4.6.2.1.3 Charakterisierung des Virusgenoms

Zur weiteren Charakterisierung der vermutlich zwei Virusisolate aus Pool F23 sollte untersucht werden, ob es sich bei dem Virusgenom um einzelsträngige RNA in negativer Strangorientierung, wie sie bei den Bunyaviren vorliegt, handelt. Es wurden die Sequenzfragmente des Polymerasegens A und Polymerasegens B zum Nachweis der Art des Virusgenoms ausgewählt. Zusätzlich zur Untersuchung eines Nukleokapsidgens wurden Primer für Contig 4 (Accession number EF423169), welches Homologien zum Nukleokapsidgen von Sandfly-Fever Virus (F23-K19, S-Segment, Phlebovirus-like) aufwies, ausgewählt. Eine Übersicht über die Nomenklatur gibt Tab. 4.9, die ausgewählten Primer sind in Tab. 3.2 wiedergegeben.

Tab. 4.9: Übersicht über die Nomenklatur der zu untersuchenden Sequenzbereiche.

	Bezeichnung des Isolats	zugehörige Contigs	Sequenzlänge	Accession number
Polymerasegen A	F23-K1	Contig 20, 17, 2, 9	3,60 kb	EF423167
Polymerasegen B	F23-K4	Contig 16, 10	1,51 kb	EF423168
Nukleokapsidgen	F23-K19	Contig 4	609 bp	EF423169

Überstand aus infizierter Zellkultur wurde mit RNase und DNase behandelt, um virale mRNAs aus infizierten Zellen, die bei einer Zelllyse freigesetzt werden können, vor dem Aufschluss der Viruspartikel zu verdauen. RNA wurde mit Tri Reagent® extrahiert, um RNasen zu inaktivieren. Die cDNA-Synthese erfolgte in An- und Abwesenheit von reverser Transkriptase mit Random Primern und mit den spezifischen Primern in entgegengesetzter Orientierung für F23-K1F/R (Polymerasegen A), F23-K4F/R (Polymerasegen B) bzw. für F23-K19F/R (Nukleokapsidgen) zeigte. Mit je vier Ansätzen für F23-K1, F23-K4 und F23-K19 wurde anschließend eine konventionelle PCR mit den für jedes Gen spezifischen Primern durchgeführt. Nach der PCR wurden die Proben auf einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Bei allen drei untersuchten Genen war im Ansatz ohne reverse Transkriptase kein PCR-Produktnachzuweisen, was darauf hinweist, dass es sich um Sequenzen von RNA-Viren handelt. Bei Verwendung der spezifischen Primer für die cDNA-Synthese konnte bei allen drei Genen nur bei Verwendung der Forward Primer das spezifische PCR-Produkt auf dem Agarosegel nachgewiesen werden. Das Genom des oder der Isolats/e aus Pool F23, besteht somit aus einzelsträngiger RNA in negativer Strangorientierung, wie es bei Bunyaviren vorliegt.

4.6.2.1.4 Etablierung einer quantitativen Real-Time PCR (Standardreihen Taq Man)

Um eine quantitative Nachweismethode für das, bzw. die Virusisolat/e aus dem Pool F23 zu etablieren, wurde für die Sequenzfragmente F23-K1, -K4 und -K19 jeweils spezifische Plasmide hergestellt.

Hierfür wurden durch die PCR jeweils mit den spezifischen Primern (F23-K1F/R, F23-K4F/R und F23-K19F/R, Tab. 3.2) Amplifikate in der Größe von 305 bp, 144 bp und 460 bp aus dem Überstand infizierter Zellkulturen amplifiziert und in den pCR2.1 Vektor (3908 bp) kloniert. Die Klone wurden mit vektorspezifischen Primern in der Kolonien-PCR auf die jeweiligen Inserts geprüft. Für jedes Sequenzfragment (F23-K1, -K4 und -K19) wurde ein positiver Klon ausgewählt, über Nacht in 3 ml LB-Medium kultiviert und das Plasmid präpariert (3.17). Es wurde die DNA-Konzentration photometrisch ermittelt und die Kopienzahl des Plasmids errechnet (3.18). Für jede Zielsequenz wurde eine sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonde ausgewählt (Tab. 3.2), um in der quantitativen *Real-Time* PCR die Konzentration der in der Probe enthaltenen Kopien ermitteln zu können.

Die Konzentration des Plasmids für F23-K1 betrug 54,6 ng/ μ l, für F23-K4 102 ng/ μ l und für F23-K19 424 ng/ μ l. Nach der unter 3.18 dargestellten Formel wurden die Kopienzahlen berechnet und für jedes Segment durch serielle Verdünnung eine Standardreihe von 10^6 bis 10^1 Kopien/ μ l angefertigt und in der quantitativen *Real-Time* PCR eingesetzt (Abb. 4.21).

Alle drei erhaltenen Standardgeraden (Abb. 4.21 b, d, f) zeigten eine Steigung von ca. -3,5 ct/log-Stufe. Daraus lässt sich ableiten, dass die PCR-Reaktionen effizient abgelaufen sind. Die erhaltenen Doppelwerte zeigten nur geringe Schwankungen. Damit lassen sich die Zielsequenzen Polymerasegen A, Polymerasegen B und das Nukleokapsidgen mit dieser Methode spezifisch nachweisen und quantifizieren.

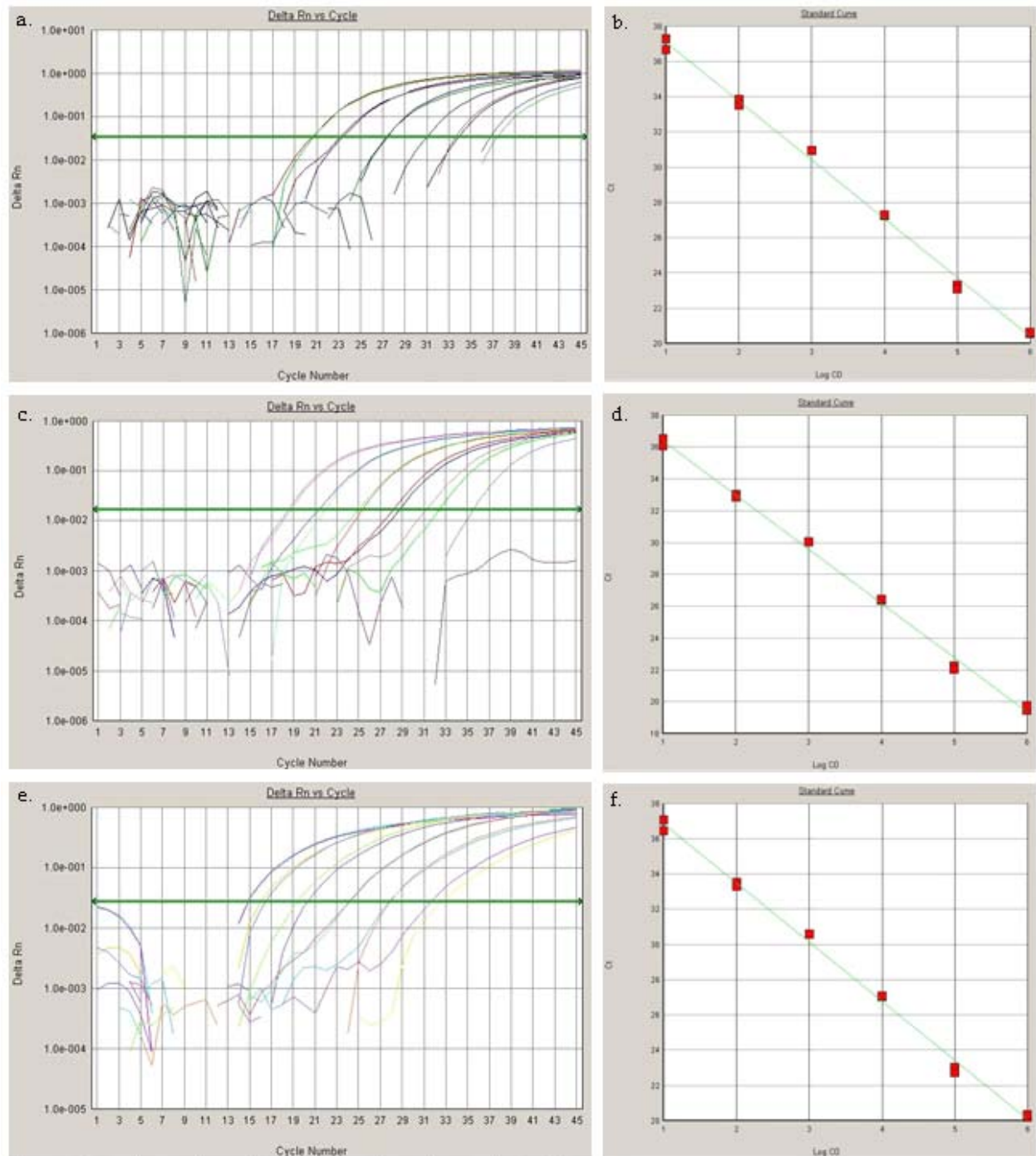


Abb. 4.21: Etablierung spezifischer *Real-Time* PCR Systeme für F23-K1, -K4 und -K19. *Real-Time* PCR bei der jeweils 2 μ l des Plasmidstandards von 10^6 bis 10^1 Kopien/ μ l eingesetzt wurden; a. F23-K1 Amplifikationskurven der Plasmidstandards von 10^6 bis 10^1 Kopien/ μ l, b. F23-K1 Ableitung der Standardkurven zur Ermittlung der Effizienz, c. F23-K4 Amplifikationskurven der Plasmidstandards von 10^6 bis 10^1 Kopien/ μ l, d. F23-K4 Ableitung der Standardkurven zur Ermittlung der Effizienz, e. F23-K19 Amplifikationskurven der Plasmidstandards von 10^6 bis 10^1 Kopien/ μ l, f. F23-K19 Ableitung der Standardkurven zur Ermittlung der Effizienz.

4.6.2.1.5 Erregerprävalenz in den verschiedenen Zonen

Mit den etablierten *Real-Time* PCR Systemen für F23-K1 (Polymerasegen A), F23-K4 (Polymerasegen B) und F23-K19 (Nukleokapsidgen) wurden die 98 Pools, die in der Zellkultur einen CPE verursacht haben, auf das Vorhandensein dieser viralen Genomfragmente aus Pool F23 unter den beschriebenen Bedingungen untersucht (3.10.2, 3.11, 3.14).

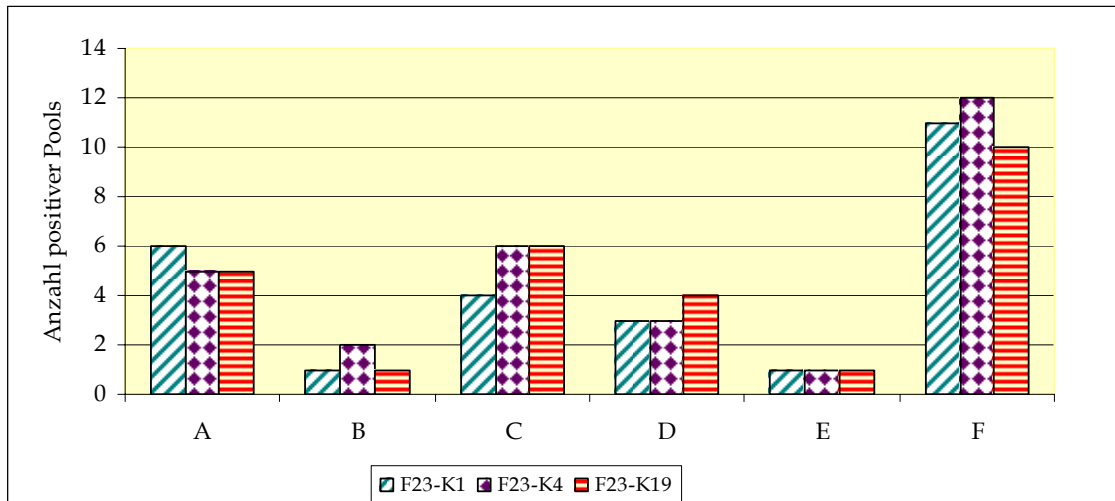


Abb. 4.22: Anzahl der Pools, die in der Zellkultur einen CPE gezeigt haben und positiv auf das Polymerasegen A (F23-K1), das Polymerasegen B (F23-K4) und das Nukleokapsidgen (F23-K19) getestet wurden. Aus infiziertem Zellkulturüberstand wurde RNA extrahiert und eine cDNA-Synthese mit Random Primern durchgeführt. 2 µl cDNA wurden jeweils in der spezifischen *Real-Time* PCR getestet.

Insgesamt wurden die verschiedenen Zielsequenzen in 35 Kulturen (34%) detektiert (Abb. 4.22, Tab. 4.10). Im Dorf (Zone F) war die Prävalenz mit 14 % am höchsten. Am Camp (Zone A) und im Sekundärwald (Zone C) halbierten sich die positiven Kulturen auf 7 % bzw. 6 %. Überraschenderweise konnten nur bei 21 Kulturen Genomkopien von Polymerasegen A (F23-K1), Polymerasegen B (K23-K4) und dem Nukleokapsidgen (F23-K19) nachgewiesen werden, was die Vermutung, dass aus diesem Pool mehrere Virusisolate angezüchtet wurden, untermauert. In zwei Kulturen konnte nur das Polymerasegen A und das Nukleokapsidgen (F23-K1 und F23-K19) und in drei Kulturen das Polymerasegen B und das Nukleokapsidgen (F23-K4 und F23-K19) detektiert werden.

Tab. 4.10: Auf Polymerasegen A (F23-K1), Polymerasegen B (F23-K4) und das Nukleokapsidgen (F23-K19) positiv getestete Überstände.

F23-K1, F23-K4 & F23-K19	F23-K1 & F23-K19	F23-K4 & F23-K19	F23-K4	F23-K1
A21	A31	C15	A45	A5
A24	D51	C23	B40	
A26		D60	C57	
A28			F28	
A52			F32	
C45			F45	
C68			F50	
C88			F53	
D28				
D50				
F23				
F25				
F26				
F27				
F30				
F33				
F35				
F47				
F54				
F55				
B42				

In keinem Fall wurde nur das Polymerasegen A und Polymerasegen B (F23-K1 und F23-K4) oder nur das Nukleokapsidgen (F23-K19) gemessen. Bei dem Nukleokapsidgen (F23-K19) könnte es sich um das Gensegment handeln, welches für das Kapsid eines Virus mit dem Polymerasegen A (F23-K1), bzw. dem Polymerasegen B (F23-K4) codiert und daher nicht getrennt von einem dieser Isolate oder umgekehrt, nachzuweisen ist. Acht der infizierten Kulturen wurden nur für Polymerasegen B (F23-K4) positiv getestet, so dass es sich hierbei um ein weiteres Virusisolat handeln könnte. Es liegen also folgende Kombinationen vor (1) Polymerasegen A, Polymerasegen B, Nukleokapsidgen (F23-K1, F23-K4, F23-K19), (2) Polymerasegen A und Nukleokapsidgen (F23-K1 und F23-K19), (3) Polymerasegen B und Nukleokapsidgen (F23-K4 und F23-K19), (4) Polymerasegen B (F23-K4) und in einem Fall (5) Polymerasegen A (F23-K1). Aus diesen Untersuchungsergebnissen lassen sich verschiedene Hypothesen ableiten, die jedoch durch die bisherigen Ergebnisse insgesamt nicht zu einem eindeutigen Ergebnis führen. Codiert F23-K19 für das Nukleokapsidgen vom Polymerasegen A (F23-K1), dann sollte es nicht mit Polymerasegen B (F23-K4) ohne Polymerasegen A (F23-K1) auftreten. Das Nukleokapsidgen F23-K19 kann auch nicht zum Polymerasegen B (F23-K4) gehören, da F23-K4 häufig alleine detektiert wurde. Möglicherweise liegen in einigen Pools im Bereich der Primer- oder Sondenbindungsstellen Sequenzvariationen vor, so dass

Pools für Zielsequenzen fälschlich negativ getestet wurden. Als weiterhin zu untersuchen gilt, ob Polymerasegen A und das Nukleokapsidgen oder ob Polymerasegen B und das Nukleokapsid zu einem Bunyavirus gehören oder ob Polymerasegen B ein weiteres Virusisolat repräsentiert.

4.6.2.2 Untersuchungen in der Zellkultur

4.6.2.2.1 Wachstumskinetik

Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens des, bzw. der aus Pool F23 isolierten Virus/en, wurde eine Wachstumskinetik über acht Tage aufgenommen.

Dazu wurden C6/36 Zellen in Doppelwerten mit Virusüberstand der 1. Passage des F23 Isolates mit einer 1:10 Verdünnung infiziert und in 48 Stunden Abständen von 0 bis 8 Tagen nach Infektion ein Aliquot des Überstands geerntet und RNA extrahiert. Es erfolgte eine cDNA-Synthese mit Random Primern, gefolgt von der für F23-K1, -K4 und -K19 etablierten spezifischen *Real-Time* PCR, um die Anzahl an Genomkopien zu bestimmen (4.6.2.1.4).

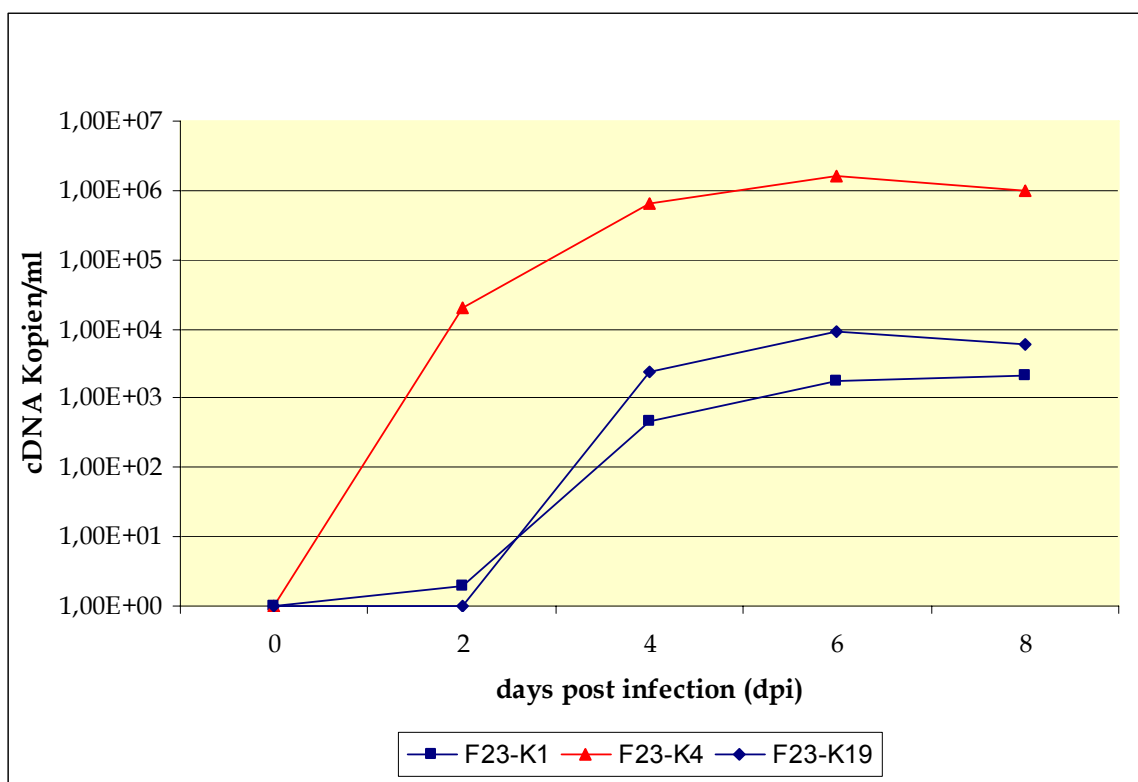


Abb. 4.23: Wachstumskinetik der aus dem Pool F23 isolierten Viren. Von 0 bis 8 dpi wurde Überstand genommen und zur RNA-Extraktion verwendet. Die mit Random Primern synthetisierte cDNA wurde in die für die Genfragmente F23-K1 (Polymerasegen A), -K4 (Polymerasegen B) und -K19 (Nukleokapsidgen) spezifischen *Real-Time* PCR Assays eingesetzt.

Aus der Auswertung der Anzahl der Genomkopien im Laufe der Messung können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden. Die Replikationsgeschwindigkeit sowie der maximale Virustiter von F23-K1, -K4 bzw. -K19 unterschieden sich stark voneinander (Abb. 4.23). Die Wachstumskinetik von F23-K1 und F23-K19 hat einen ähnlichen Verlauf. Ein signifikanter Anstieg ist erst vier Tagen nach Infektion zu messen. Nach sechs Tagen ist die Plateauphase mit $1,8 \times 10^3$ Kopien/ml für F23-K1 und $9,3 \times 10^3$ für F23-K19 erreicht. Die Replikation des Fragmentes F23-K4 ist durch einen steilen Anstieg in den ersten 48 h gekennzeichnet. Nach 48 h werden 2×10^4 Kopien/ml gemessen. Die Plateauphase wird ebenfalls nach sechs Tagen mit einer Kopienzahl von $1,6 \times 10^6$ Kopien/ml erreicht und ist somit zwei Logstufen höher als bei F23-K1 und F23-K19.

Bei Betrachtung der drei Wachstumskurven wird deutlich, dass es sich bei F23-K4 (Polymerasegen B) möglicherweise um ein eigenes Virusisolat handelt und es kann postuliert werden, dass sich mindestens zwei verschiedene Viren im Zellkulturüberstand des Pools F23 befinden.

4.6.2.2.2 Infektionsversuche verschiedener Zelllinien

Durch die Infektion verschiedener Zelllinien sollte der Zelltropismus der Viren mit den Merkmalen F23-K1 (Polymerasegens A) und F23-K4 (Polymerasegens B) untersucht werden. Hierfür wurden vor allem humane und nicht-humane Primatenzellen verwendet, um das Risiko einer Infektion für den Menschen und für Primaten abschätzen zu können. Zusätzlich wurde eine Nagerzelllinie verwendet, da Nagetiere für viele Arboviren als Reservoir dienen. Virushaltiger Überstand der zweiten Passage des Isolats F23 auf C6/36 Zellen wurde zur Infektion von den humanen Zelllinien A549, Hep2 und 293, von Primatenzelllinien VeroE6/7 und VeroB4, sowie von der Hamsterzelllinie BHK21 eingesetzt. Als Kontrolle erfolgte die Infektion von C6/36 Zellen. Nach 1 h nach der Infektion wurde von jeder Zelllinie Überstand als Nullwert abgenommen. Nach der Kultivierung von sieben Tagen wurde erneut Überstand abgenommen und auf frische Zellen passagiert. Nach der zweiten Passage wurde RNA aus den Proben 0 dpi und 7 dpi nach der ersten Infektion und der Proben 7 dpi nach der 2. Passage extrahiert. Es erfolgte eine cDNA-Synthese mit Random Primern und die Proben wurden auf Genomkopien von Polymerasegen A (F23-K1) und Polymerasegen B (F23-K4) in der quantitativen *Real-Time* PCR getestet.

In den Vertebraten-Zelllinien nahm die Virusmenge von F23-K1 und F23-K4 sieben Tage nach der Infektion im Vergleich zum Zeitpunkt der Infektion stark ab. Nach der Passage auf diesen Zellen konnten keine Genomkopien mehr nachgewiesen werden. Das Virus ist

entweder nicht in der Lage diese Zellen zu infizieren oder in ihnen zu replizieren. In der Kontrollkultur der C6/36 Zellen konnte wie erwartet eine Virusreplikation gemessen werden.

4.6.2.2.3 Untersuchungen zur Virushülle

Zur weiteren Charakterisierung der Viren aus Pool F23 wurde untersucht, ob sie eine Lipidhülle besitzen. Dazu wurde virushaltiger Zellkulturüberstand mit Äther behandelt und auf C6/36 Zellen in drei Verdünnungsstufen austitriert. Als Kontrolle wurde virushaltiger Zellkulturüberstand mit Medium versetzt und ebenfalls auf C6/36 Zellen in drei Verdünnungsstufen austitriert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch sieben Tage nach Infektion und durch die spezifische *Real-Time* PCR für die Genomfragmente F23-K1, -K4 und -K19.

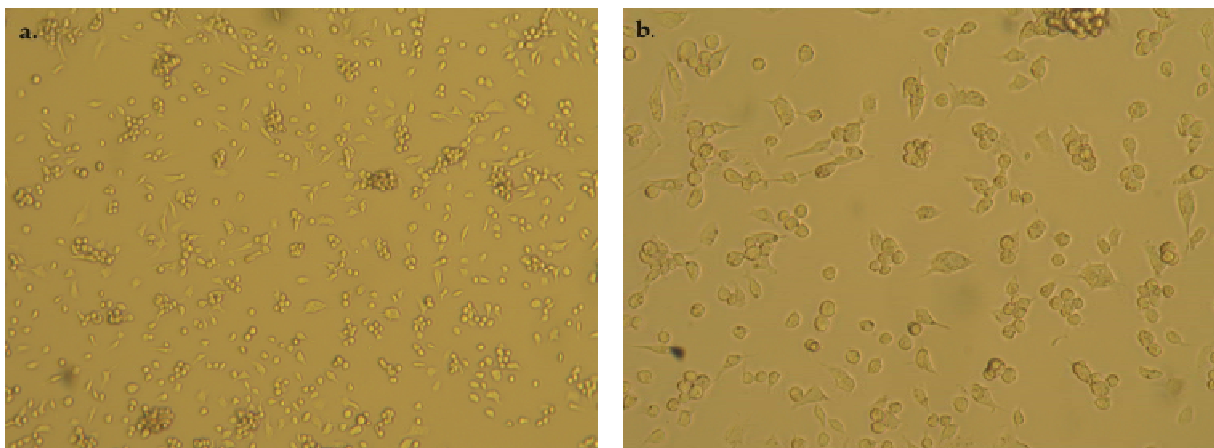


Abb. 4.24: Mit ätherbehandeltem Überstand des Pools F23 infizierte C6/36 Zellen. Virushaltiger Zellkulturüberstand wurde mit Äther ausgeschüttelt und auf C6/36 Zellen austitriert. Nach 7 dpi wurde dieser auf frische C6/36 Zellen passagiert, welche täglich mikroskopisch beobachtet wurden. Nach 7 dpi zeigte sich ein deutlicher CPE. a. Vergrößerung 12fach, b. Vergrößerung 24fach.

In keiner Verdünnungsstufe, der mit Äther behandelten Überstände, war auf den C6/36 Zellen ein CPE zu erkennen. Die Kontrollzellen hingegen zeigten einen stark ausgeprägten CPE. Nach sieben Tagen wurde aus Überstand der ätherbehandelten Kultur RNA extrahiert und eine cDNA-Synthese mit Random Primern durchgeführt. Diese wurde in der *Real-Time* PCR auf die Genomsequenzen von F23-K1, -K4 und -K19 getestet. Es konnten keine Genomkopien von Polymerasegen A (F23-K1) und vom Nukleokapsidgen (F23-K19) nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass es sich um behüllte Viren handelt. Entgegen der Erwartungen wurden 8×10^5 Kopien/ml des Polymerasegens B (F23-K4) detektiert, was darauf hinweist, dass dieses Genomfragment zu einem Äther-resistenten

nicht umhüllten Virus gehört. Dieser virushaltige Überstand wurde zur Infektion einer 175 cm² Flasche C6/36 genutzt. Nach sieben Tagen zeigten die Zellen im Gegensatz zum obigen Versuch einen deutlichen CPE (Abb. 4.24). Viruspartikel wurden aus dem Zellkulturüberstand durch ein Saccharosekissen aufkonzentriert. In der Elektronenmikroskopie wurden runde bis sphärische Viruspartikel mit einem Kapsid Durchmesser von 60 nm detektiert, welche sich von Bunyaviruspartikeln unterschieden, aber nicht weiter morphologisch eingeordnet werden konnten (keine Abbildung).

Auf Grund dieser Ergebnisse ist zu erwarten, dass es sich wahrscheinlich um zwei verschiedene Viren, ein Äther-sensitives, definiert durch das Polymerasegen A und das Nukleokapsidgen, welches morphologisch als Bunyavirus gruppiert wurde und ein Äther-resistentes, definiert durch das Polymerasegen B, handelt. Die kurzen gefundenen Sequenzhomologien von Polymerasegen B zu dem L-Segment von Orthobunyaviren können nicht zur Einordnung in eine Virusfamilie herangezogen werden, da gezeigt wurde, dass F23-K4 nicht die für Bunyaviren charakteristische Virusmorphologie besitzt. Eine Einordnung in eine Virusfamilie von F23-K4 ist an Hand dieser Daten nicht möglich und weitere Untersuchungen zur Klassifikation sind nötig. Aus den bisher erhaltenen Ergebnissen für das Polymerasegen A (F23-K1) und das Nukleokapsidgen (F23-K19) kann postuliert werden, dass die Sequenzen aus einem gemeinsamen putativen Bunyavirus stammen.

4.6.2.2.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Virusreplikation

In einem weiteren Versuchsansatz sollte untersucht werden, wo die Viren in der Zelle replizieren und auf welchem Weg sie ausgeschleust werden.

Dazu wurden in 25 cm² Flaschen ausgesäte C6/36 Zellen mit virushaltigem Zellkulturüberstand der zweiten und dritten Passage des Pools F23 inokuliert. Es erfolgte eine Fixierung der Zellen nach 3 dpi, 4 dpi, 5 dpi und 6 dpi. Die fixierten Zellen wurden von den Flaschen gelöst und zu Ultradünnschnitten verarbeitet. Bei der elektronenmikroskopischen Analyse der Zellen waren zu keinem Zeitpunkt Viruspartikel in den Zellen sichtbar. Eine Wiederholung des Versuches mit Veränderungen in der MOI und dem Zeitpunkt der Zellfixierung erbrachte ebenfalls keine Ergebnisse.

Die Versuche haben gezeigt, dass sich im virushaltigen Zellkulturüberstand des Pools F23 mindestens zwei verschiedene Viren befinden, ein behülltes (F23-K1, F23-K19) und ein unbehülltes (F23-K4) Virus. In der Elektronenmikroskopie wurden bunyavirus-ähnliche

Partikel und nach Ätherbehandlung Partikel, die morphologisch nicht bekannten Virusfamilien zugeordnet werden konnten, detektiert. Übereinstimmend mit der elektronenmikroskopischen Klassifizierung und den Sequenzdaten, besteht das Genom der von F23-K1 und F23-K19 aus einzelsträngiger RNA in negativer Strangorientierung, wie es bei Bunyaviren vorliegt. Ebenso weist F23-K4 einzelsträngige RNA in negativer Strangorientierung vor. Generierte Sequenzen zeigten auf Aminosäureebene geringe Homologien zu unterschiedlichen Genera von Bunyaviren. F23-K1 und F23-K19 zeigen Homologien zu Phleboviren, und zwar einmal zum L-Segment und einmal zum S-Segment. Das unbehüllte Virus F23-K4 wies zwar Homologien zum L-Segment von Orthobunyaviren auf, jedoch ist nach der gültigen Virus-Taxonomie eine Einordnung auf Grund der fehlenden Lipidmembran zur Familie der *Bunyaviridae* nicht wahrscheinlich. Für eine Einordnung dieses Erregers sind zusätzliche Sequenzdaten und virologische Untersuchungen nötig. Die Wachstumsuntersuchungen unterstützen die Hypothese, dass sich zwei verschiedene Viren im primären Isolat von Pool F23 befinden. Das Wachstumsverhalten von F23-K4 unterscheidet sich deutlich von F23-K1 und F23-K19. Für F23-K1 und F23-K19 wird vermutet, dass sie für das L-Segment und das S-Segment eines putativen Bunyavirusisolats codieren. Die Prävalenz dieser Viren in den Moskito-Pools, die einen CPE gezeigt haben, ist hoch (34 %) und diese Isolate sind in allen sechs Zonen vertreten (Abb. 4.22). Eine Virusreplikation wurde jedoch nur auf C6/36 Zellen festgestellt.

Den Ergebnissen zufolge, sind aus Pool F23 und aus vielen anderen Pools ein putatives Bunyavirus (F23-K1, F23-K19) und ein nicht näher klassifizierbares unbehülltes Virus mit Homologien zum Polymerasegen von Orthobunyaviren (F23-K4) isoliert worden.

4.6.3 Untersuchungen des Pools B14

Der Überstand infizierter C6/36 Zellen, die mit dem Pool B14 inokuliert wurden, war in den *Real-Time* PCR Assays für YFV, WNV, DENV 1-4 negativ. Jedoch konnte in einer generischen Flavivirus *Real-Time* PCR Nukleinsäure amplifiziert werden. Der Vergleich der erhaltenen Sequenz mit Sequenzen der Datenbank (NCBI) zeigte jedoch zu keiner bekannten Sequenz Homologie. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung von virushaltigem Zellkulturüberstand, konnten überraschenderweise Orbiviren nachgewiesen werden. Dieses Virusisolat sollte nun in der Zellkultur und molekulargenetisch untersucht und charakterisiert werden.

4.6.3.1 Untersuchungen in der Zellkultur

4.6.3.1.1 Untersuchungen zur Virushülle

Um nachzuweisen, ob es sich bei dem zytopathogenen Virusisolat, um ein umhülltes oder nicht-umhülltes Virus handelt, wurde virushaltiger Zellkulturüberstand, wie für die Isolate aus Pool B3 und F23 beschrieben, mit Äther behandelt und anschließend in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4} auf C6/36 Zellen austitriert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach sieben Tagen.

Alle Kulturen zeigten einen deutlichen CPE. Somit handelt es sich hier um ein unbehülltes Äther-resistentes Virus.

4.6.3.1.2 Infektionsversuche verschiedener Zelllinien

Zur Untersuchung des möglichen Wirtsspektrums des Erregers aus dem Pool B14, wurden verschiedene Zelllinien mit diesem Virus infiziert werden. Dazu wurden die Hamsterzelllinie BHK21, die Primatenzellen VeroE6/7 und VeroB4, sowie drei menschliche Zelllinien (A549, 293 und Hep2) mit einer MOI von 1 der dritten Passage infiziert. Da der Erreger auf Insektenzellen bei 28°C kultiviert wurde, wurden für diesen Infektionsversuch zwei verschiedene Temperaturen gewählt. Zum einen wurden die Zellen wie gewohnt bei 37°C inkubiert und in einem zweiten Ansatz bei 33°C, um der Temperatur bei der das Virus auf den C6/36 Zellen replizierte, etwas näher zu kommen. Die Zellen wurden drei Mal passagiert und täglich mikroskopisch untersucht. Nach drei Passagen wurde der Überstand jeder Zelllinie auf den Insektenzellen austitriert.

Keiner der Überstände von den Mammalierzellen, die mit dem Virusisolat aus Pool B14 infiziert worden waren, löste auf C6/36 Zellen einen CPE aus. Eine Replikation des Erregers aus dem Pool B14 konnte in den getesteten Vertebraten-Zelllinien nicht nachgewiesen werden.

4.6.3.1.3 Untersuchungen zur Virusreplikation in der Zelle

Um die Virusreplikation innerhalb der Zelle verfolgen zu können, wurden Ultradünnschnitte von infizierten Zellen elektronenmikroskopisch untersucht und zum anderen Virusantigene in infizierten Zellen mit Immunfluoreszenztesten dargestellt.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden C6/36 Zellen mit virushaltigem Überstand der 3. Passage mit einer MOI von 10 infiziert. Die Zellen wurden nach 25 h, 32 h, 48 h und 72 h fixiert, zu Ultradünnschnitten verarbeitet und

elektronenmikroskopisch ausgewertet.

Für den Immunfluoreszenztest wurden infizierte und fixierte C6/36 Zellen mit dem α B14 spezifischen Antiserum, welches 42 Tage nach Immunisierung gewonnen wurde, inkubiert (3.23). Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Kaninchenspezifischen IgG Sekundärantikörper und eine Zellkernfärbung. Die Auswertung der Proben erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

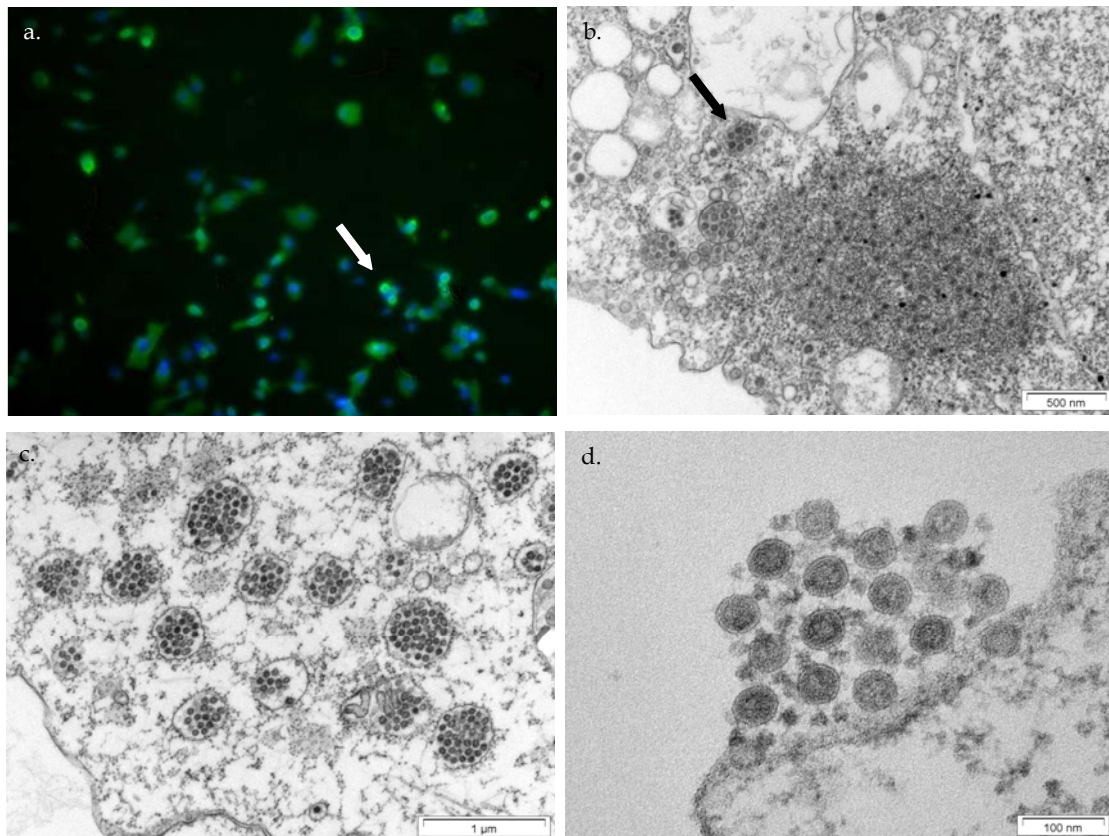


Abb. 4.25: Mikroskopischer Nachweis von Virusantigenen aus dem Pool B14 in infizierten Zellen. Immunfluoreszenztest auf das Virusisolat aus Pool B14 in infizierten C6/36 Zellen (a, 12fach) und elektronenmikroskopische Darstellung infizierter C6/36 Zellen in Ultradünnschnitten (b-d). Der Zweitantikörper war mit Cy3 markiert und die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Pfeil unter a deutet auf eine Zelle, bei der man deutlich erkennt, dass sich die Virusantigene nur im Cytoplasma der Zelle befinden. Der Pfeil unter b zeigt die Anhäufung der Virionen in sogenannten *Inclusion bodies*, welche unter c in einer höheren Vergrößerung dargestellt sind. Eine Anhäufung von Viren außerhalb der Zelle nach 72 h sind unter d dargestellt.

Es konnten spezifische Antigene gegen das Virusisolat aus dem Pool B14 nachgewiesen werden und Virusantigene wurden nur im Cytoplasma und nicht im Zellkern gefunden (Abb. 4.25 a). Die Viren lassen sich im Elektronenmikroskop in sogenannten *Inclusion bodies*, in denen zwischen sieben und weit über 20 Viruspartikel vereinigt sein können, nach 72 h darstellen (Abb. 4.25 b,c). In Abb. 4.23 d sind Viren außerhalb der Zelle zu sehen. Möglicherweise fusioniert die Membran der *Inclusion bodies* mit der Zellmembran und setzt

so die Viren frei. Da Reoviren keine Lipide und keine Hülle besitzen wird eine Freisetzung der Virionen durch eine Fusion der Membran der *Inclusion bodies* mit der Zellmembran, um die Viren unbehüllt freizusetzen, für möglich gehalten (Modrow *et al.*, 2003).

4.6.3.2 Molekulargenetische Untersuchungen

4.6.3.2.1 Amplifikation von viralen Genomfragmenten

Durch PCR mit Random Primern und Klonierung der PCR-Produkte sollten weitere Informationen zum Virusaufbau gewonnen werden (s. 3.20; Stang *et al.*, 2005).

Insgesamt wurden 80 Klone mittels Kolonien-PCR auf die Größe der enthaltenen PCR-Produkte überprüft (Abb. 4.26). Alle Amplifikate, die größer als 260 bp waren, wurden sequenziert (Sequenzen können auf Wunsch angefordert werden). Nur wenige der erhaltenen Sequenzen überlappten, so dass längere Fragmente entstanden (Tab. 4.11).

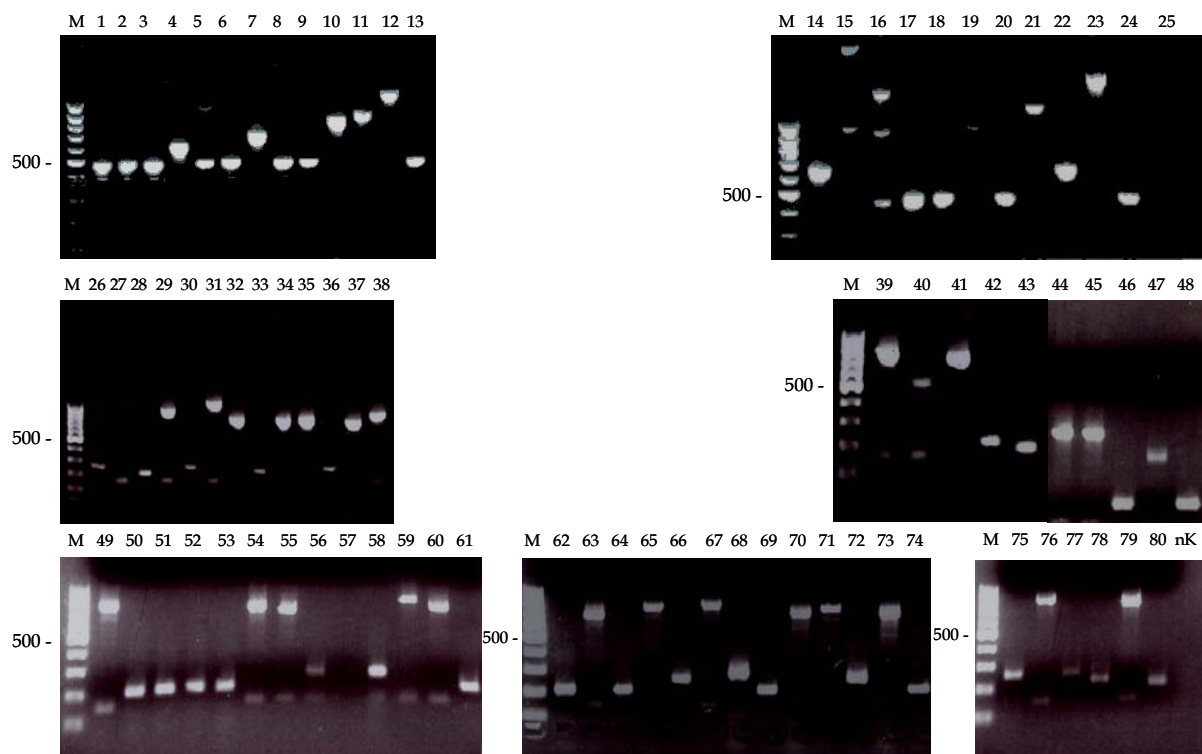


Abb. 4. 26: Random-Amplifikate nach der Kolonien-PCR aufgetrennt auf einem 1,5 %igen Agarosegel. Als Molekulargewichtsstandard diente ein 100 bp Marker. Virusinfizierter Zellkulturüberstand wurde aufkonzentriert, RNA extrahiert und mit Random Primern, die eine Ankersequenz besitzen, cDNA synthetisiert. In der PCR erfolgte eine Amplifikation mit für die Ankersequenz spezifischen Primern.

Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen zu bekannten Sequenzen aus der Gen-Datenbank erbrachte keine messbare Verwandtschaft zu viralen oder nicht viralen Sequenzen. Es wurden zwar Homologien auf Nukleotid- und Aminosäureebene zu Flaviviren,

Herpesviren, Togaviren, Plasmodien und Moskitos gefunden, aber immer nur über kurze Sequenzbereiche von 20 bis 30 Nukleotiden. Da diese Sequenzen keine Verwandtschaft zu zellulären Genen aufwiesen, ist es wahrscheinlich, dass es sich zum großen Teil um virale Sequenzen handelt.

Mit dieser Methode war es möglich, aus den einzelnen Klonen insgesamt ca. 26 kb an bisher unbekannten Sequenzen zu gewinnen, die möglicherweise auf ein Virusisolat aus Pool B14 zurückgehen. Verwandtschaft zu anderen Viren auf Nukleotid- oder Aminosäureebene konnte nicht festgestellt werden. Die Daten legen nahe, dass es sich hierbei um ein neues Virus mit sehr geringer Homologie zu den Genomen bekannter Viren handelt.

Tab. 4.11: Sequenzanalyse von in Contigs angeordneten Klonen des Pools B14 nach der mit Random Primern durchgeführten Amplifikation mit der öffentlichen Datenbank (NCBI BLAST).

Contig	Länge (bp)	Verwandtschaft Nukleinsäureebene	Verwandtschaft Aminosäureebene
2	718	Japanese Enzephalitis (38/42, 90%) ^a	Iguape Virus (95/217, 43%) ^b ; Murray Valley Enzephalitis Virus (88/219, 40%) ^b St. Louis Enzephalitis Virus (86/219, 39%) ^b
9	1219	Chlorella Virus (21/21, 100%) ^a ; <i>Aedes albopictus</i> (30/32, 93%) ^a	<i>Aedes aegypti</i> (21/58, 36%) ^b
11	355	Porcine endogenous retrovirus PV-B7 (30/30, 100%) ^a ; Hawaiian Green Turtle Herpesvirus (30/30, 100%) ^a	keine Homologien
16	484	Gelbfieber Virus (23/24, 95%) ^a ; <i>Plasmodium falciparum</i> (20/20, 100%) ^a	<i>Anopheles gambiae</i> (54/149, 36%) ^b ; <i>Aedes albopictus</i> (43/143, 30%) ^b
27	569	Barmah Forest Virus (23/24, 95%) ^a ; VEEV (21/21, 100%) ^a	<i>Anopheles gambiae</i> (27/48, 56%) ^b
28	541	VEEV (21/21, 100%) ^a	<i>Anopheles gambiae</i> (48/119, 40%) ^b
29	497	VEEV (21/21, 100%) ^a	keine Homologien
30	471	<i>Aedes aegypti</i> (35/36, 97%) ^a ; VEEV (23/23, 100%) ^a	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i> (24/74, 32%) ^b
1	1619	keine Homologien	<i>Aedes aegypti</i> (52/167, 31%) ^b ; <i>Plasmodium falciparum</i> (27/115, 23%) ^b
3	638	keine Homologien	<i>Plasmodium falciparum</i> (33/128, 25%) ^b
5	798	keine Homologien	Cercopithecine herpesvirus 7 (26/82, 31%) ^b ; Yellow Head Virus (20/80, 25%) ^b
12	699	Hepatitis C Virus (21/21, 100%) ^a	keine Homologien
20	348	keine Homologien	<i>Plasmodium chabaudi</i> (9/25, 36%) ^b
26	278	<i>Aedes aegypti</i> (26/26, 100%) ^a Venezuelan Enzephalitis Virus (VEEV) (23/23, 100%) ^a	keine Homologien
31	563	VEEV (26/26, 100%) ^a	keine Homologien
32	546	Barmah Forest Virus (24/25, 96%) ^a	keine Homologien
33	523	Barmah Forest Virus (22/22, 100%) ^a	keine Homologien

Tab. 4.11: Fortsetzung

Contig	Länge (bp)	Verwandtschaft Nukleinsäureebene	Verwandtschaft Aminosäureebene
34	378	Fort Morgan Virus (23/23, 100%) ^a	keine Homologien
36	613	Mayaro Virus (25/26, 100%) ^a ; EEEV (21/21, 100%) ^a	keine Homologien
37	401	EEEV (24/24, 100%) ^a	keine Homologien
38	522	keine Homologien	keine Homologien
39	107	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus (22/23, 95%) ^a ; VEEV (22/23, 95%) ^a	keine Homologien
40	597	Mayaro Virus <20; Cercopithecine Herpesvirus 1 <20	keine Homologien
41	220	Mayaro Virus (20/20, 100%) ^a Getah Virus (22/23, 95%) ^a	keine Homologien
43	541	<i>Aedes aegypti</i> (42/46, 91%) ^a ; Mayaro Virus (25/26, 96%) ^a	keine Homologien
47	632	Hepatitis C virus (20/20, 100%) ^a	keine Homologien
48	573	VEEV (20/20, 100%) ^a	keine Homologien
keine Homologien zu veröffentlichten Sequenzen:			
4	526		
6	265		
7	105		
8	161		
10	643		
13	579		
14	785		
15	298		
17	692		
18	787		
19	714		
21	612		
22	603		
23	463		
24	397		
25	442		
35	579		
42	584		
44	517		
45	359		
46	477		
49	455		
50	520		
51	519		

^a Anzahl gleicher Nukleotide; ^b Anzahl gleicher Aminosäuren

4.6.3.2.2 Analyse der Nukleinsäure

Ausgehend von der Morphologie der Virionen war eine Infektion mit Orbiviren in Pool B14 zu erwarten. Ob das Genom, wie bei Orbiviren, aus segmentierter, doppelsträngiger RNA besteht, sollte untersucht werden. Dazu sollte unter RNase-freien Bedingungen extrahierte Nukleinsäure mit RNase und in einem weiteren Ansatz mit DNase verdaut auf einem 1 %igen Agarosegel für 60-90 min bei 60 V aufgetrennt werden. Es wurden 2 µg Nukleinsäure auf das Gel aufgetragen, um auch dann noch Banden sehen zu können, wenn das Virusgenom auf mehrere Fragmente aufgeteilt ist. Zur Schonung der RNA wurden die Gele erst im Anschluss an die Auftrennung gefärbt.

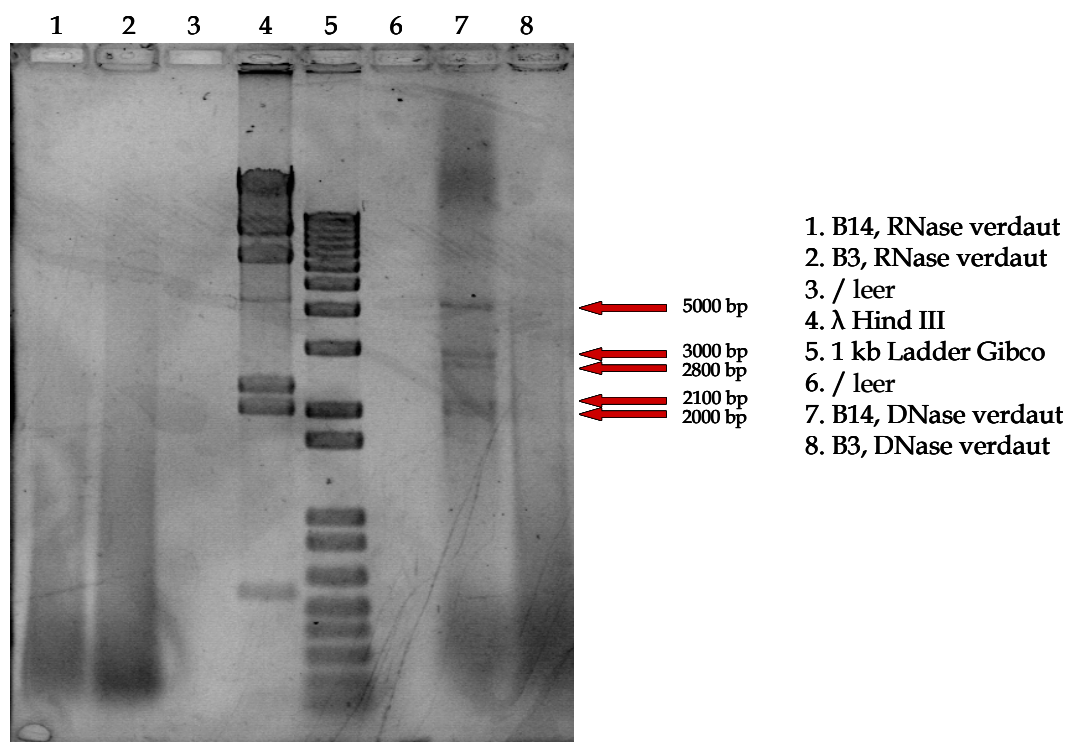


Abb.4.27: Auftrennung der Genome aus Pool B3 und B14 auf einem 1%igen Agarosegel unter RNase-freien Bedingungen. Es wurden jeweils 2 µg Nukleinsäure für 1 h mit RNase oder DNase verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Nukleinsäure wurden in dem mit DNase verdauten Ansatz fünf Banden, in der Größe von ca. 2000 bp, 2100 bp, 2800 bp, 3000 bp und 5000 bp, sichtbar (Abb. 4.27). In der mit RNase verdauten Spur waren keine Banden zu erkennen. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass das Genom des Virus aus dem Pool B14 aus segmentierter RNA besteht, welche mindestens in fünf Fragmenten vorliegt. Zur genauen Bestimmung der Anzahl der Segmente müssten die Banden aus dem Gel extrahiert und analysiert werden. Über Klonierung und Sequenzierung der extrahierten Banden, wäre eine phylogenetische Einordnung des Virus vorstellbar.

Im Elektronenmikroskop wurden im virushaltigen Zellkulturüberstand aus Pool B14 für Orbiviren charakteristische Partikel nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass die Virionen keine Lipidhülle besitzen und ein fragmentiertes RNA-Genom besitzen, wie es für Orbiviren beschrieben ist. Die Virusreplikation erfolgt im Cytoplasma der Zelle und die Reifung der Virionen in *Inclusion bodies*. Eine Virusvermehrung wurde nur in C6/36 Zellen gemessen. Von zusammengerechnet über 26 kb Sequenzinformation verteilt auf einzelne Fragmente konnte weder auf Aminosäureebene noch auf Nukleotidebene Verwandtschaft über längere Sequenzbereiche zu anderen Viren gefunden werden. Die zu anderen Viren gefundenen Homologien waren so gering, dass eine Einordnung auf Grund von Sequenzhomologien nicht möglich ist. Bei dem vorliegenden Virusisolat handelt es sich um ein Virus mit der für Orbiviren charakteristischen morphologischen Gestalt mit bisher unbekannter Sequenzinformation.

4.6.4 Untersuchungen des Pools F24

Der virushaltige Zellkulturüberstand von C6/36 Zellen wurde in der quantitativen *Real-Time* PCR negativ auf verschiedenste Flaviviren getestet. Im Elektronenmikroskop konnten Coronaviren identifiziert werden, welche weiter charakterisiert werden sollten.

4.6.4.1 Molekulargenetische Untersuchungen

4.6.4.1.1 PCR Screening auf Coronaviren

Zunächst wurde Überstand aus infizierter Zellkultur in der *Real-Time* PCR auf Coronaviren getestet. Dazu wurde RNA extrahiert und eine cDNA-Synthese mit Random Primern durchgeführt. Die Probe wurde mit Primern für unterschiedliche Coronaviren in der PCR getestet (229E up, 229E do, Corona TMGB 229E, CoV all F, CoV all R, CoV OC R, CoV 229 R, CoV NLR, CoV Sars R, CoV bat Sars R, CoV TMGB (Nitsche *et al.*, in Vorbereitung)). Zusätzlich wurden die einzelnen Ansätze noch auf einem Agarosegel aufgetrennt, um PCR-Produkte sichtbar zu machen, auf welche die Sequenz der Sonde nicht gepasst haben könnte. Die Probe war für keinen der verschiedenen *Real-Time* PCR Assays positiv, allerdings waren auf dem Agarosegel bei den PCR Assays auf CoV Sars, CoV Bat Sars und 229E PCR-Produkte sichtbar. Diese hatten zwar nicht die erwartete Größe, wurden aber zur weiteren Identifizierung sequenziert. Die Qualität der Sequenzdaten war sehr schlecht und es konnte keine Verwandtschaft zu viralen Sequenzen in der Datenbank gefunden werden.

In einem zweiten Versuch erfolgte die cDNA-Synthese mit oligo-dT Primern, da Coronaviren am 5'-Ende des Genoms einen Poly-A-Schwanz besitzen und so die Umschreibung des viralen Genoms spezifischer erfolgen sollte. Diese wurde in der PCR mit den Primern CoV all F und CoV all R getestet, die auf viele unterschiedliche Coronaviren passen. Auf dem Agarosegel zeigte sich keine spezifische Bande, sondern ein breiter Schmier von schwacher Intensität. Versuche, diese PCR-Produkte zu klonieren, blieben ohne Erfolg und es konnte keine Sequenzinformation mittels Coronavirus-spezifischer Primer gewonnen werden.

4.6.4.1.2 Amplifikation viraler Genomfragmente

Mit der für die anderen näher charakterisierten Viren bereits beschriebenen Methode der Amplifikation viraler Genomfragmente über *Random Priming*, deren Klonierung und Sequenzierung, sollte versucht werden das Virusgenom näher zu charakterisieren (3.20, Stang *et al.*, 2005).

Nach der PCR-Reaktion waren keine Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese sichtbar und nach Klonierung waren keine Kolonien auf der LB-Platte zu finden. Auch nach mehrmaligen Versuchen waren nach der Random-Amplifikation keine PCR-Produkte auf dem Agarosegel sichtbar und es bildeten sich keine Kolonien auf der LB-Platte, so dass diese Strategie für dieses Virusisolat aufgegeben wurde.

4.6.4.2 Untersuchungen in der Zellkultur

4.6.4.2.1 Infektionsversuche mit verschiedenen Zelllinien

Zur Untersuchung des möglichen Wirtsspektrums des Erregers aus dem Pool F24, wurden wie in den vorherigen Versuchen verschiedene Zelllinien (BHK21, VeroE6/7, VeroB4, A549, 293, Hep2) mit einer MOI von 1 mit diesem Virus infiziert, drei Mal passagiert und auf Insektenzellen austitriert.

Keiner der Überstände enthielt Viruspartikel, die in der Lage waren auf C6/36 Zellen einen CPE auszulösen. Eine Replikation des Erregers konnte auf den sechs getesteten Zelllinien nicht nachgewiesen werden.

4.6.4.2.2 Virusnachweis in infizierten Zellen

Als spezifisches Nachweissystem für diesen Erreger wurde der Immunfluoreszenztest verwendet (3.23).

Es wurden Antikörper gegen das Virusisolat aus dem Pool F24 eingesetzt (Abb. 4.28). Die Antikörper reagierten mit F24-infizierten Zellen bis zu einer Verdünnung von 1:10.000. Die nicht infizierte Kontrollkultur und auch das Präserum α -F24 waren negativ (nicht dargestellt). Virusantigene sind nur im Cytoplasma zu finden und liegen dort sowohl in punktförmigen Antigenansammlungen als auch entlang der Zellmembran vor. Das Nukleoprotein (N) und auch das Hüllprotein (E) sind wichtige virale Antigene, die an der Oberfläche infizierter Zellen zu finden sind (van Regenmortel *et al.*, 2002). Es konnte bestätigt werden, dass Virusantigene nur im Cytoplasma infizierter Zellen zu finden sind (Macnaughton *et al.*, 1980; Monto and Rhodes, 1977; Hamre *et al.*, 1967). Außerdem lassen die Phasenkontrastbilder infizierter Kulturen vermuten, dass infizierte Zellen fusioniert haben (Macnaughton *et al.*, 1980; Monto and Rhodes, 1977; Hamre *et al.*, 1967).

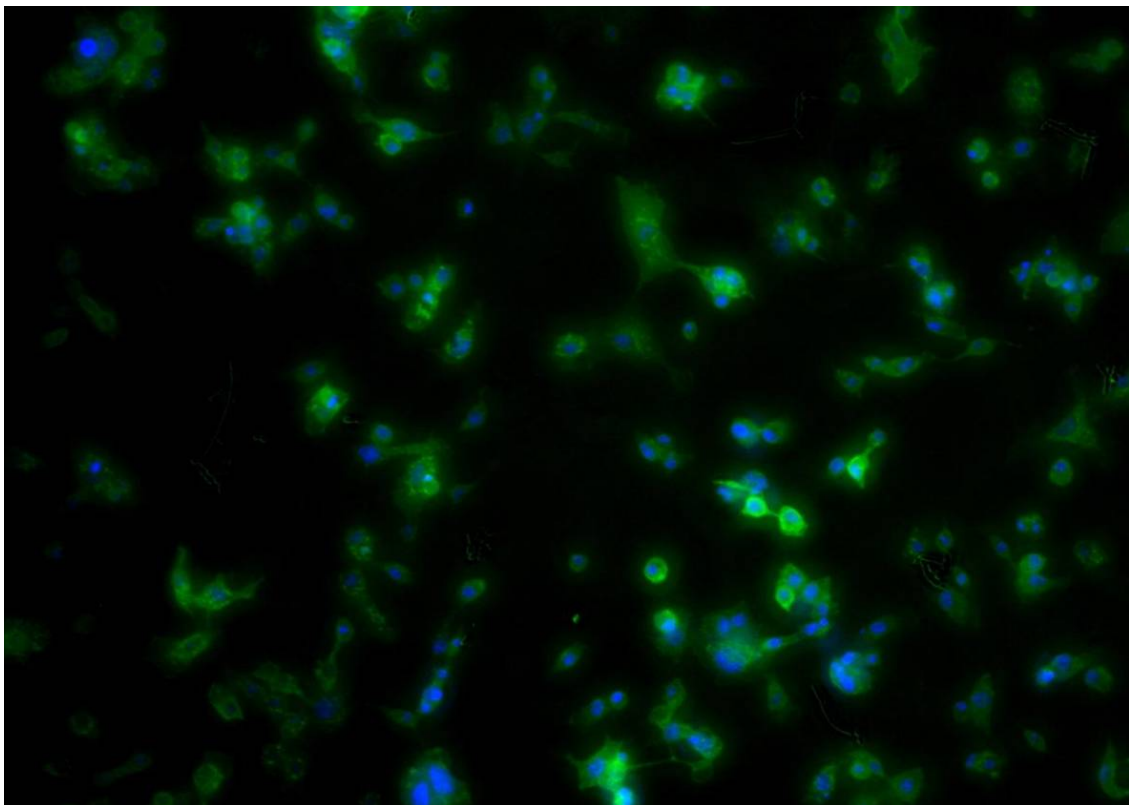


Abb. 4.28: Immunfluoreszenztest zum Nachweis des Coronavirusisolats aus Pool F24. Infizierte C6/36 Zellen wurden fixiert und ein spezifischer Erstantikörper mit den Zellen inkubiert. Als Zweitantikörper wurde Anti-Kaninchen IgG verwendet. Der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper war mit Cy3 markiert und die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.

Es war nicht möglich von den in der Elektronenmikroskopie nachweisbaren Coronavirus-Partikeln aus virushaltigem Zellkulturüberstand des Pools F24 Sequenzinformation zu generieren. Sowohl mit für Coronaviren etablierten Primern, als auch mit der Methode zur Random-Amplifikation von viralen Genomfragmenten, war es nicht möglich Sequenzen zu amplifizieren. Das Virus vermehrte sich nur in C6/36 Zellen und die Replikation erfolgte in diesen Zellen im Cytoplasma.

4.6.5 Untersuchungen der Pools C23 und D24

Die Homogenate der Pools C23 und D24 verursachten auf C6/36 Zellen vergleichbare morphologische Veränderungen. Der Überstand der infizierten Zellen wurde mittels *Real-Time* PCR negativ auf verschiedene Flaviviren getestet. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Pools wurden in den Überständen infizierter Zellkulturen morphologisch Rhabdoviren festgestellt. Diese beiden Isolate sollten auf molekularer Ebene und in der Zellkultur näher untersucht werden.

4.6.5.1 Untersuchungen in der Zellkultur

4.6.5.1.1 Infektionsversuche mit verschiedenen Zelllinien

Zur Untersuchung des Wirtsspektrums der Rhabdoviren aus den Pools C23 und D24, wurden die Zelllinien BHK21, VeroE6/7, VeroB4, A549, 293 und Hep2 mit einer MOI von 1 mit diesen Viren infiziert. Die Zellen wurden einmal bei 33°C und in einem weiteren Versuchsansatz bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal passagiert und die Auswertung erfolgte durch tägliches Mikroskopieren. Nach drei Passagen wurde der Überstand jeder Zelllinie auf Insektenzellen austiriert.

Zu keiner Zeit waren morphologische Veränderungen der verwendeten Vertebratenzelllinien zu beobachten. Lediglich die Kulturen, die bei 33°C gehalten wurden, wiesen wie erwartet ein verlangsamtes Wachstum auf. Keiner der Überstände löste auf C6/36 Zellen einen CPE aus, so dass eine Vermehrung dieser Erreger auf den sechs untersuchten Vertebratenzelllinien nicht nachgewiesen werden konnte.

4.6.5.1.2 Virusnachweis in infizierten Zellen

Um ein spezifisches Nachweissystem für den Erreger aus Pool D24 zu erhalten und die Virusreplikation in der Zelle untersuchen zu können, wurde zum Nachweis von Virusantigenen in infizierten Zellen virusspezifische Antikörper hergestellt (3.23).

Antikörper gegen das Isolat aus Pool D24 konnten bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 des Antiserums Virusantigene in infizierten C6/36 Zellen nachweisen (Abb. 4.29). Nicht infizierte Kontrollzellen, sowie das Präserum, waren in der Immunfluoreszenz negativ (nicht dargestellt).

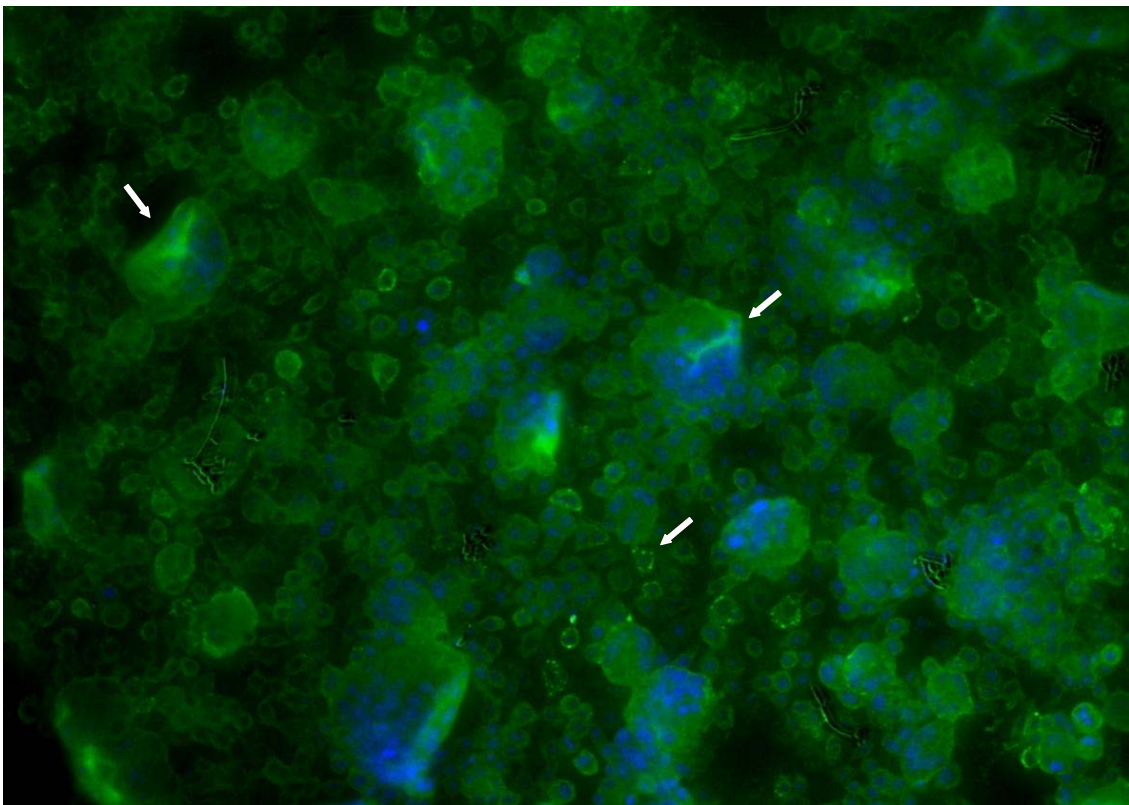


Abb. 4. 29: Immunfluoreszenztest zum Nachweis der Rhabdovirusantigene des Isolates aus Pool D24. Infizierte C6/36 Zellen wurden fixiert und mit α -D24 inkubiert. Als Zweitantikörper wurde Anti-Kaninchen IgG verwendet, das mit Cy3 markiert war. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Pfeile deuten auf zu Synzitien verschmolzene Zellen und auf eine einzelne Zelle, bei der die Viruspartikel an der Zellwand in punktförmigen Antigenansammlungen in hoher Konzentration vorliegen.

Wie auch schon in der primären Zellkultur durch Phasenkontrast beobachtet, bilden die Zellen nach der Infektion große Synzitien, wobei die Membranen benachbarter Zellen verschmelzen und die Zellkerne sich zusammenlagern. Die Fusion von Zellen und die Bildung von großen Synzitien, ist ein charakteristischer CPE für eine Infektion mit Rhabdoviren (Zhou *et al.*, 2006; Iwanowicz and Goodwin, 2002; Nishiyama *et al.*, 1977). In Zellen, die noch einzeln vorliegen, befinden sich die Viruspartikel entlang der Zellmembran

in Vesikeln in hoher Konzentration, in fusionierten Zellen jedoch im gesamten Cytoplasma der Zelle. Bei einer Infektion mit Rhabdoviren sind verschiedenen Zellorganellen betroffen, so dass es zu einer Verteilung der Virusantigene im Cytoplasma kommt. Die Viren dringen über Endozytose in die Zelle ein und durch lysosomale Aktivität wird das Nukleokapsid ins Cytoplasma freigesetzt (van Regenmortel *et al.*, 2002). Die Transkription findet in Polysomen und die Translation im Cytoplasma statt. Anschließend erfolgen Modifikation des G Proteins am endoplasmatischen Retikulum und am Golgi Apparat. Die Freisetzung der Virionen erfolgt in den meisten Fällen durch Knospung an der Zellmembran, aber bei einigen Lyssaviren über *Inclusion bodies*. Bei den zu erkennenden Virusantigenen in Vesikeln in der Nähe der Zellmembran könnte es sich um die beschriebenen *Inclusion bodies* handeln.

4.6.5.2 Molekulargenetische Untersuchungen

4.6.5.2.1 Amplifikation viraler Genomfragmente

Um die beiden Isolate (C23, D24) in die Familie der *Rhabdoviridae* einordnen zu können, wurden wie schon beschrieben, eine PCR mit Random Primern durchgeführt (Stang *et al.*, 2005).

Die RNA-Extraktion, die cDNA-Synthese mit Random Primern und die Amplifikation der cDNA, sowie die anschließende Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgten wie beschrieben (3.20).

Es wurden 50 Klone von Pool C23 mit der Kolonien-PCR analysiert. Davon beinhalteten 29 Klone nur Vektor. Die restlichen 21 Klone mit Inserts über 260 bp wurden sequenziert und mit der Datenbank NCBI verglichen (Tab. 4.12).

Tab. 4.12: Sequenzanalyse der Random-Amplifikate nach der Kolonien-PCR von Pool C23.

Contig	Länge (bp)	Verwandtschaft NS	Verwandtschaft AS
1	678	Flanders Virus large protein (71/95, 74%) ^a	Chandipura Virus (129/202, 63%) ^b ; Isfahan Virus (125/200, 62%) ^b ; Siniperca-Chuatsi Rhabdovirus (127/200, 63%) ^b ; Vesicular-Stomatitis Virus (127/199, 63%) ^b
3	354	Culex Flavivirus (48/56, 85%) ^a ; Apoi Virus (33/36, 91%) ^a ; Kamiti-River Virus (32/35, 91%) ^b	Culex Flavivirus (90/99, 90%) ^b ; Kamiti-River Virus (81/97, 83%) ^b ; Cell fusing agent Virus (81/97, 83%) ^b
2	211	keine Homologien	keine Homologien
4	213	keine Homologien	keine Homologien

^a Anzahl gleicher Nukleotide; ^b Anzahl gleicher Aminosäuren

Dabei zeigte sich, dass 16 Sequenzen zellulären Ursprungs waren. Bei zwei Sequenzen wurde weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäureebene Verwandtschaft zu bekannten Sequenzen gefunden (Sequenzen können auf Wunsch angefordert werden). Zwei Fragmente zeigten auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene Ähnlichkeit zu Rhabdoviren. Bei einem Fragment von 678 bp zeigte ein kurzer Teilbereich auf Nukleotidebene 74 % (71/95 Nt) Homologie zu Flanders Virus und auf Aminosäureebene 63 % (129/202) zu Chandipura Virus (Accession number EF423170). Ein weiteres Fragment von 354 bp wies 83 % Homologie auf Nukleinsäureebene (54/65 Nt) und auf Aminosäureebene (81/97 AS) zu Kamitit-River Virus auf (Accession number EF423171).

Von Pool D24 wurden ebenfalls 50 Klone in der Kolonien-PCR auf die Länge der Inserts untersucht. Dabei zeigte sich, dass 5 Klone zwei Banden beinhalteten, so dass diese Banden über ein Gel aufgetrennt und einzeln aus dem Gel extrahiert wurden. Alle resultierenden 55 Ansätze wurden sequenziert und in der Datenbank auf Verwandtschaften untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass 45 Klone nur die Vektorsequenz enthielten und sechs Amplifikate aus der Zellkultur stammten (Tab. 4.13). Eine Sequenz von 727 bp (Accession number EF423172) zeigte auf Nukleotidebene Verwandtschaft zum Chandipura Virus (47/57, 82%) und auf Aminosäureebene zum Vesicular-Stomatitis Virus (154/216, 71%). Bei den restlichen 3 Sequenzen konnte weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäureebene Verwandtschaft zu bekannten Sequenzen festgestellt werden (Sequenzen können auf Wunsch angefordert werden).

Tab. 4.13: Sequenzanalyse der Random Amplifikate nach der Kolonien-PCR von Pool D24.

Contig	Länge (bp)	Verwandtschaft Nukleinsäureebene	Verwandtschaft Aminosäureebene
2	727	Chandipura Virus L gene (47/57, 82%) ^a	Vesicular-Stomatitis Virus (154/216, 71%) ^b ; Starry-Flounder Rhabdovirus (148/213, 69%) ^b
1	227	keine Homologien	keine Homologien
3	212	keine Homologien	keine Homologien
4	303	keine Homologien	keine Homologien

^a Anzahl gleicher Nukleotide; ^b Anzahl gleicher Aminosäuren

Die aus Pool C23 und Pool D24 isolierten Viren führen auf C6/36 Zellen nach Infektion zur Ausbildung von Synziten, wobei die Membranen mehrerer Zellen verschmelzen und die Zellkerne sich zusammenlagern. Virusantigene wurden nur im Cytoplasma der Zellen gefunden. Infektionsversuche mit unterschiedlichen Primatenzelllinien verliefen negativ. Ebenso erwies sich eine Amplifikation viraler Genombereiche der aus den Pools C23 und D24 isolierten Viren als schwierig, da im Großteil der Fälle Genomsequenzen der Zellen

amplifiziert wurden. Jedoch wurden aus beiden primären Isolaten Sequenzen isoliert, die Verwandtschaft zu Rhabdoviren zeigten. Die Ergebnisse sind im Einklang mit der Elektronenmikroskopie. Aufgrund der geringen Homologien zu anderen Rhabdoviren und der Mehrzahl an Sequenzen, die zu keiner bekannten Sequenz Homologien aufwiesen, scheint es sich um zwei Isolate eines Rhabdovirus oder um zwei neue Rhabdoviren zu handeln. Zur weiteren Beschreibung der Viren aus Pool C23 und D24 sind Untersuchungen zur Art und Größe des Genoms, Sequenzinformationen zur phylogenetischen Einordnung und ein Erregernachweis mittels PCR, um die Prävalenz dieser Erreger in den anderen Pools zu untersuchen, nötig.

5 Diskussion

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der Beschreibung von Viren, die aus Moskitos isoliert wurden, die in verschiedenen Regionen des Tai Nationalparks gefangen wurden. Zudem sollten die gewonnenen entomologischen und ökologischen Daten soweit wie möglich mit in die Auswertungen einbezogen werden, um Hinweise über eine mögliche Erregerübertragung von einem Habitat in ein anderes, insbesondere in Grenzgebieten des tropischen Regenwaldes zu erhalten und somit eventuelle Gefahrenpotentiale für das Auftreten von neuen Infektionskrankheiten zu identifizieren.

5.1 Einfluss von exogenen Faktoren auf die Vektor- und Virenprävalenz

Das Risiko einer Infektion mit vektorübertragenen Krankheiten hängt entscheidend von der Prävalenz der Vektoren, der Prävalenz von Amplifikatoren und im Falle von mosquitoübertragenen Krankheiten von der Stechrate (Anzahl der Weibchen, die pro Zeiteinheit einen Menschen stechen) ab. Vorkommen, Dichte und Verteilung von Vektoren werden wiederum durch eine Vielzahl von Faktoren, wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Vegetation, Nahrungsangebot, Brutstätten, usw. bestimmt (Kramer und Ebel, 2003). Durch Arboviren verursachte Epidemien unter der menschlichen Bevölkerung treten vorwiegend in tropischen Regionen der Erde auf (Mutebi und Barrett, 2002; Guzman *et al.*, 2002; Mackenzie, 2005), wo sich in den letzten Jahren durch menschliche Eingriffe Umweltfaktoren und das Klima einzelner Gebiete stark verändert haben. Zur Untersuchung des Einflusses solcher Veränderungen auf die Vektor- und Virenprävalenz, ist ein Vergleich von Daten vor und nach Veränderung des Ökosystems ideal. Da in vielen Fällen Daten zur Ausgangssituation fehlen, können auch Erhebungen zu Temperatur und Luftfeuchtigkeit, sowie die Spezieszusammensetzung und die Charakterisierung der Viren von ökologisch veränderten Gebieten herangezogen und mit Erhebungen in einem angrenzenden Gebiet mit den ursprünglichen ökologischen Bedingungen verglichen werden.

Um in dieser Studie die sechs Zonen klimatisch miteinander vergleichen zu können, wurden parallel zu den Moskitofallen tagsüber Messgeräte zur Ermittlung der Temperatur und Luftfeuchtigkeit an jedem Fangort angebracht. Dabei zeigte sich, dass die Temperatur im Durchschnitt außerhalb des Regenwaldes im Sekundärwald (Zone C), in den Plantagen (Zone D), Feldern (Zone E) und im Dorf (Zone F) zwischen 0,7 °C und 2,5 °C höher lag als innerhalb des Primärwaldes (Zone B). Am Camp (Zone A), welches eine relativ kleine gerodete Fläche von ca. 150 m² innerhalb des Primärwaldes darstellt, war eine

Temperaturerhöhung von 1,2 °C im Vergleich zum Primärwald zu messen. Im Primär- und Sekundärwald wurde die Temperatur auch in verschiedenen Höhen gemessen. Während die maximale Durchschnittstemperatur im Primärwald in 32 m Höhe immer um einige Grad unter der in 16 m und 1 m Höhe gemessenen lag, war es im Sekundärwald im Bereich der Baumkronen (16 m Höhe) deutlich wärmer als in 8 m und 1 m Höhe. Somit verhalten sich diese beiden Gebiete bezüglich ihrer Wärmekapazität entgegengesetzt. Vergleichbare Daten wurden bei der Messung der Luftfeuchtigkeit ermittelt. So zeigte sich, dass im Primärwald die höchste Luftfeuchtigkeit gemessen wurde, die bis zum Dorf abnahm. Auch am Camp (Zone A) war eine Verringerung der Luftfeuchtigkeit um 0,8 % zu verzeichnen. Die Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsveränderungen am Camp machen den starken Einfluss den selbst kleine Veränderungen in einem intakten Ökosystem bewirken können deutlich.

Diese Daten zeigen, dass Temperatur und Luftfeuchtigkeit der sechs Habitate stark unterschiedlich sind und lassen vermuten, dass durch die Rodung des Regenwaldes, die Bepflanzung von Plantagen und Feldern, sowie die Entstehung von neuen Dörfern das ursprüngliche Klima stark verändert wurde. Ebenso wurde die ursprüngliche Vegetation vernichtet und durch andere Pflanzenarten ersetzt. Somit ist davon auszugehen, dass sich die Zusammensetzung von Vektoren, die an ihr spezifisches Mikroklima angepasst sind, verändert.

Würden Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Vegetation keinen Einfluss auf die Artzusammensetzung von Moskitos haben, sollten in den sechs untersuchten Zonen überwiegend die gleichen Arten zu finden sein. Jedoch konnten hier starke Unterschiede festgestellt werden. So wurden im Dorf (Zone F) zum großen Teil *Anopheles*-Arten gefangen, die auch noch in den Feldern (Zone E), in den Plantagen (Zone D) und in sehr geringer Anzahl im Sekundärwald (Zone C) gefunden wurden. An keinem der fünf Fangorte im Primärwald (Zone B) wurden *Anopheles*-Moskitos gefangen. Allerdings konnten an zwei Camps (Zone A, AIII, AIV), die sich nahe beieinander in einer großen Freifläche und an der Piste, die aus dem Park führt, befinden, *Anopheles*-Moskitos gefangen werden. An zwei weiteren Camps (AI, AII) im Primärwald, wovon sich eines ebenfalls an einer Piste, die aus dem Park führt, befindet, konnten keine *Anopheles*-Moskitos gefangen werden. Die Freifläche dieser beiden Camps (AI, AII) beträgt allerdings nur ein Bruchteil von der der anderen beiden Camps und die Anzahl an Menschen beträgt im Schnitt nur ein Fünftel. Moskitos der Gattung *Anopheles* wurden auch in früheren Studien in Côte d'Ivoire nicht im Primärwald gefunden (Doucet, 1960 a). Eine andere Studie hat gezeigt, dass *Anopheles*-Moskitos bevorzugt durch menschliche Einwirkung entstandene Brutstätten, wie Reisfelder, Bewässerungsrinnen und umgepflügte Äcker gegenüber natürlichen Flussufern und

Fischteichen nutzen (Matthys *et al.*, 2006). Die urbane agrarwirtschaftliche Landnutzung kann zu günstigen Bedingungen für die Entstehung von Moskitobrutstätten und damit zu einer erhöhten Diversität an *Anopheles*-Moskitos beitragen, welche Malaria übertragen. Dieses Ergebnis wurde mit den hier ermittelten Daten bestätigt, denn die höchste Diversität an *Anopheles*-Moskitos der sechs untersuchten Zonen wurde im Dorf gefunden. Das Vorhandensein von *Anopheles*-Moskitos korreliert mit der Nähe zu Menschen. Somit stimmen die Ergebnisse dieser Studie mit publizierten Daten überein (Doucet, 1960a, Matthys *et al.*, 2006).

Ebenfalls habitatspezifische Moskitos sind *Uranotaenia*-Arten, welche im Primärwald im Schnitt acht Mal mehr gefangen wurden als in den Zonen C-F (Sekundärwald bis Dorf), wobei die Anzahl gefangener Moskitos zum Dorf hin stetig abnahm. Diese Verteilung von *Uranotaenia*-Arten in Wald und Savanne wurde auch schon in einer früheren Studie gefunden (Doucet, 1960a). Zusätzlich zu der unterschiedlichen Verteilung in den Zonen, wurde auch eine artspezifische Verteilung in der Höhe festgestellt. *Uranotaenia mashaensis* wurde vorwiegend in 32 m Höhe, *Uranotaenia ornata* hingegen in 1 m Höhe über dem Waldboden gefangen.

Culex-Arten waren über alle Zonen ungefähr gleich verteilt, wie vorher schon beschrieben (Doucet *et al.*, 1960 b).

Hingegen konnten *Aedes* Arten nur sehr selten gefangen werden. Dies kann daran liegen, dass *Aedes*-Moskitos tagaktiv sind und sich im Kronenbereich der Bäume aufhalten (Cordellier und Akoliba, 1981) und die tagsüber verwendeten *Gravid Traps* direkt über dem Waldboden installiert wurden. Aber auch für die *Aedes*-Arten wurde eine habitatspezifische Verteilung gefunden. Sowohl nachts als auch tagsüber wurden im Vergleich mit den anderen Gebieten im Sekundärwald zehn Mal so viele *Aedes*-Moskitos gefangen, was zum einen darin begründet sein kann, dass in dieser Zone die Prävalenz am höchsten ist oder zum anderen, dass die Weibchen von dem Wasser der *Gravid Traps* stärker angelockt wurden, weil die Vegetation weniger hoch und dicht und damit der Sekundärwald sehr trocken ist.

Untersucht man die Verteilung der Moskitospezies innerhalb und außerhalb des Regenwaldes in unterschiedlichen Habitaten, so kann man an Hand des Vorkommens repräsentativer Mosquitoarten einen Rückschluss auf die ökologischen Bedingungen dieser Gebiete ziehen. Der Einfluss humaner Aktivitäten auf die Tsetse-Population des Primärregenwalds im Taï Nationalpark und umliegender Gebiete und die damit erhöhte Gefahr einer Ausbreitung von Epidemien wurde in einer früheren Studie beschrieben

(Laveissiere und Kienou, 1979). Und zwar wurde für *Glossina palpalis*, welche die Schlafkrankheit übertragen können, gezeigt, dass diese entlang von Wegen, an Camps oder entlang der Piste im Primärwald konzentriert sind und außerhalb des Waldes in den Plantagen und in den Dörfern zu finden sind. Vergleichbare Daten wurden in der vorliegenden Arbeit für das Vorkommen von *Anopheles*-Moskitos ermittelt.

Eine entomologische Studie, bei der Daten zu vier verschiedenen Insekten-Familien erhoben wurden, hat gezeigt, dass sich die Arten des Primärwaldes nicht an das veränderte Milieu anpassen und nach Rodung und Bewirtschaftung ehemaliger Regenwaldgebiete die Artenvielfalt abgenommen hat (Courturier *et al.*, 1984). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie im Dorf eine doppelt so hohe Artenvielfalt wie im Primärwald gemessen. Allerdings wurden im Dorf viele verschiedenen *Anopheles*-Arten gefunden, wodurch die Diversität stark zugenommen hat, wie auch von Matthys *et al.* (2006) für ein anderes Gebiet in Côte d'Ivoire beschrieben.

Für jede Zone, in der die Probensammlung stattgefunden hat, sind die zwei Arten genannt, die am häufigsten zu finden waren:

Camp (Zone A)	x10 (<i>Cx. Eum. spp.</i>), <i>Uranotaenia spp.</i>
Primärwald (Zone B)	<i>Uranotaenia mashaensis</i> , <i>Uranotaenia ornata</i>
Sekundärwald (Zone C)	<i>Cx. decens</i> , x2 (<i>Cx. decens spp.</i>)
Plantagen (Zone D)	<i>Culex annulioris</i> , <i>Culex decens</i>
Felder (Zone E)	<i>Culex annulioris</i> , <i>Culex decens</i>
Dorf (Zone F)	<i>Anopheles gambiae</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i>

Vergleicht man die am häufigsten vorkommenden Arten der sechs Zonen miteinander, so lassen sich drei Gruppen bilden. Sowohl am Camp (Zone A) als auch im Primärwald (Zone B) sind *Uranotaenia*-Arten zu finden. Während im Primärwald hingegen *Uranotaenia*-Arten am häufigsten gefunden wurden, treten am Camp als häufigste Art *Culex*-Moskitos auf, welche sich vermehrt in trockeneren Gebieten mit mehr Sonneneinstrahlung finden lassen. Sekundärwald, Plantagen und Felder bilden die zweite Gruppe, die durch die hohe Prävalenz von *Culex decens* Moskitos gekennzeichnet sind. Im Sekundärwald sind *Culex decens* und *Culex decens spp.* die zwei am häufigsten vertretenen Arten. In den Plantagen und Feldern wurde *Culex annulioris* als häufigste Art gefunden, *Culex decens* jedoch nur noch als zweithäufigste Art. Das Dorf präsentiert die dritte Gruppe, die dadurch gekennzeichnet ist, dass *Anopheles gambiae* als häufigste und *Culex quinquefasciatus* als zweithäufigste Art gefunden wurde. Obwohl der Sekundärwald teilweise noch die Vegetation von degradiertem Primärwald besitzt, erkennt man an der Verteilung der repräsentativen Moskitoarten jeder Zone, vor allem der Spezies *Culex*, dass die Grenze zwischen Regenwald

und Flächen außerhalb des Regenwaldes zwischen Primär- und Sekundärwald verläuft und der Sekundärwald daher im Bezug auf die Verteilung der Moskitospezies eher denen der Plantagen und Felder ähnlich ist. Das Vorkommen von *Culex*-Moskitos als häufigste Art am Camp zeigt, wie die Erhebungen zu Temperatur und Luftfeuchtigkeit, dass sich die ökologischen Verhältnisse am Camp und im Primärwald voneinander unterscheiden.

Zwischen 1950 und 1980 wurden intensive entomologische Untersuchungen im Taï Nationalpark durchgeführt, aber die Untersuchungsergebnisse wurden oft nur in ivoirischen, d.h. schwer zugänglichen Zeitschriften veröffentlicht oder sind in vielen Fällen in den Jahresschriften verschiedener Institutionen erschienen. In der vorliegenden Studie wurden weitaus mehr verschiedene und andere Arten als im Regenwald von Banco (Abidjan) gefunden (Doucet, 1960a). Von den für Côte d'Ivoire angegebenen Arten wurden in der vorliegenden Studie nur neun Arten gefunden (www.mosquitocatalog.org). Möglicherweise kommen die anderen in dieser Studie gefundenen Arten durch die Verwendung von anderen Fallen und durch das Fangen in verschiedenen Höhen zustande. Vergleicht man die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Moskitoarten mit den für Côte d'Ivoire beschriebenen Vektoren des *Institut de recherche pour le développement* (www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/), sind auf der Internetseite einige Arten verzeichnet, die auch in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, aber im *Mosquitocatalog* nicht genannt sind. Allerdings bezieht sich diese Liste primär auf aus Moskitos isolierte Viren und eignet sich nicht als Bestandsliste der Moskitopopulation. Erschwerend für einen Vergleich mit publizierten Daten kommt hinzu, dass ein Großteil der in der vorliegenden Arbeit gefangenen Moskitos nicht bis zur Art bestimmt werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Taï Nationalpark und umliegenden Gebieten mehr Moskitoarten gefunden wurden, als in der zur Verfügung stehenden Literatur beschrieben sind. Es konnte gezeigt werden, dass viele Moskitoarten bestimmte Habitate bevorzugen und dass Veränderungen der Habitate zu einer Änderung in der Populationszusammensetzung führen. Inwieweit Veränderungen des Ökosystems durch menschliche Eingriffe die Moskitopopulationen beeinflusst oder verändert haben, kann nur spekuliert werden, da ein Vergleich mit Angaben in der Literatur nur sehr eingeschränkt möglich war.

Die Diversität an Moskitospezies könnte durch die verwendeten Fallen, bei denen die Moskitos durch Licht, bzw. zuckerhaltiges Wasser angelockt und durch einen Ventilator eingesaugt wurden, eingeschränkt worden sein. Licht und zuckerhaltiges Wasser sind jedoch keine spezifischen Reize an denen Moskitos ihren Wirt ausmachen und von anderen

Lebewesen unterscheiden können. Mit solchen Fallentypen werden vor allem Stechmückenarten gefangen, die keine ausgeprägte Wirtsspezifität zeigen. Die meisten für den Menschen gefährlichen Moskitos sind jedoch auf diesen als Wirt spezialisiert (antropophil) und werden von solchen Fallen selten erfasst. Im Regenwald dienen bestimmte Affenarten als Wirte und auf diese Affen spezialisierte Moskitos werden von den Fallen ebenfalls nicht durch spezifische Reize angelockt. Fehlende spezifische Reize sind besonders bei den in den Häusern aufgehängten Fallen im Dorf als ein Problem anzusehen, da hier die Ausdünstungen der in Fallennähe schlafenden Menschen höchstwahrscheinlich eine größere Anziehungskraft auf die Moskitos ausgeübt haben, als die *Light Traps*. Vergleicht man diese Fallentypen mit den Fangergebnissen, wo Menschen auf ihnen gelandete Moskitos mit einem Aspirator einfangen (*human bait catch*), so sind die Fangraten für Dengue- und Malariavektoren um das 10-1000fache niedriger (Geier, 2000). Um dieses Problem so weit wie möglich zu lösen und ein breiteres Spektrum an Moskitos zu fangen, wurden drei zusätzliche Lockmittel (Octanol, CO₂ produzierende Handwärmer und getragene Socken) an unterschiedlichen Tagen verwendet. Fallen, an denen als Vergleich ein Lockstoff angebracht wurde, enthielten drei Mal so viele Moskitos wie Fallen ohne Lockstoff. Im Gegensatz zu einer anderen Studie, die besagt, dass CO₂ als Lockstoff unbedeutend ist (Geier, 2000), erzielte CO₂ bessere Fangergebnisse als Fallen ohne zusätzlichen Lockstoff. Welcher der drei Lockstoffe die meisten Moskitos anlockte, variierte zwischen den einzelnen Fangorten, und es ist kein signifikanter Unterschied im Fangergebnis zwischen den verwendeten Lockstoffen zu erkennen.

Das Risiko einer Infektion mit vektorübertragenen Krankheiten wird durch die Anzahl von Vektoren, der Infektion der Vektoren mit Viren und dem Wirtsspektrum der Viren bestimmt. Von daher wurde als erstes die Moskitodichte (Anzahl gefangener Moskitos/Fangeinheit) in den sechs Zonen miteinander verglichen. Beim Vergleich der Moskitodichte in den Zonen A-F (Camp bis Dorf), ist zu erkennen, dass zwar im Primär- und Sekundärwald (Zone B und C) die Moskitodichte insgesamt am höchsten ist, d. h. in diesen Zonen wurden pro Fangeinheit die meisten Moskitos gefangen. Jedoch beruht die hohe Anzahl gefangener Moskitos im Primärwald fast ausschließlich auf *Uranotaenia*-Arten, die als nicht antropophil beschrieben sind (Edwards, 1941). Daraus lässt sich ableiten, dass für den Menschen, der sich am Boden befindet, die höchste Gefahr gestochen zu werden im Dorf und in den Plantagen besteht, da hier die Dichte an antropophilen *Anopheles*- und *Culex*-Spezies am höchsten ist. Im Sekundärwald besteht eine erhöhte Gefahr, da anzunehmen ist, dass sich die *Culex*-Moskitos auch aus 8 m Höhe durch einen Menschen am Waldboden anlocken lassen. Außerdem

wurde hier die höchste Dichte an *Aedes*-Moskitos gefunden, welche Vektoren für Gelbfieber- und Dengue-Viren sind.

Unterstützend konnte in einer Studie, die die Verteilung von *Aedes*-Moskitos im intakten Primärwald, im Sekundärwald, in den Plantagen und in einem Dorf in derselben Region untersucht hat, gezeigt werden, dass im Primärwald am Boden die geringste Gefahr besteht gestochen zu werden (Cordellier *et al.*, 1981). Außerdem wurde in derselben Studie, durch Auszählen der durch *human bait catch* gefangenen Moskitos, gezeigt, dass das Risiko im Sekundärwald gestochen zu werden drei Mal so hoch wie im degradierten Primärwald und 12 Mal höher als im intakten Primärwald ist. Vergleichbare Daten wurden auch in dieser Studie gefunden. Ausgehend von der Moskitodichte antropophiler Arten ist das Risiko gestochen zu werden im Dorf (Zone F) vier bis fünf Mal höher als im intakten Primärwald (Zone B). Hingegen der Erwartungen wurden in den Mais- und Reis-Feldern (Zone E) nur sehr wenige Moskitos gefangen. Die Ursache dafür könnte beim Reisfeld sein, dass das Feld drei bis vier Wochen vor der Probennahme mit Insektiziden behandelt wurde. Diese Behandlung wurde allerdings erst nach der Probennahme bekannt. Die Maispflanzen hatten erst eine Höhe von 0,8 bis 1 m und waren noch nicht reif, was ebenfalls eine Ursache für die geringe Moskitodichte sein könnte. Die Kaffee- und Kakaopflanzen hingegen besaßen reife Früchte und dort war die Moskitodichte zwei bis drei Mal höher als im Maisfeld.

Für eine Einschätzung der risikoreichsten Zonen wurden als zweites die gefangenen Moskitos auf eine Infektion mit Viren überprüft. Als erschwerender Faktor kam hier hinzu, dass es relativ unbekannt war, welche Viren zu erwarten waren. Als Kriterium einer erfolgreichen Virusisolation wurde das Auftreten eines CPE in der Zellkultur gewertet. Von 437 untersuchten Pools verursachten 98 einen CPE auf C6/36 Zellen (22,4%). Die Anzahl CPE verursachender Pools war im Dorf (Zone F) und im Sekundärwald (Zone C) mit 6,9 % am höchsten. Dies waren auch die Zonen, wo die meisten Viren zu erwarten waren. Im Primärwald (Zone B) war die Anzahl CPE verursachender Pools nur noch halb so hoch (3,4 %) und in den Plantagen (Zone D, 2,7 %) und Camps (Zone A, 2,3 %) wurden nur noch ca. ein Drittel so viele CPE verursachende Pools wie im Dorf und Sekundärwald gefunden. Von den 30 Pools der Reis- und Mais-Felder (Zone E) induzierte nur ein Pool einen CPE (0,2 %). Somit hat die Auswertung der Ergebnisse aus der Zellkultur verdeutlicht, dass sich Primär- und Sekundärwald stark voneinander unterschieden. Im Sekundärwald verursachten doppelt so viele Pools einen CPE wie im Primärwald, d.h. hier ist mit doppelt so vielen Virusisolaten zu rechnen.

Die Analyse zum Einfluss von exogenen Faktoren auf die Vektor- und Virenprävalenz hat gezeigt, dass sich das Klima durch die Rodung des Regenwaldes, die agrarwirtschaftliche Nutzung der gerodeten Flächen und der Konstruktion der Dörfer stark verändert hat. Im Sekundärwald, welcher als Übergangszone zwischen Primärwald und Plantagen angesehen werden kann, besteht sowohl durch eine erhöhte Moskitodichte, als auch durch eine hohe Virusprävalenz, ein erhöhtes Risiko einer arboviralen Infektion und einer Einschleppung von Viren in neue Gebiete.

5.2 Virologische Untersuchungen

Studien, die die Prävalenz von Arboviren in Moskitos untersuchen, wurden in Afrika und Südamerika fast ausschließlich bei Gelbfieber- und Dengue-Epidemien unter der humanen Bevölkerung durchgeführt (Mendez *et al.*, 2006; Akoua-Koffi *et al.*, 2001; Pisano *et al.*, 1997). Eine zu dieser Arbeit vergleichbare Studie, bei der die Moskitopopulation in ökologisch verschiedenen Habitaten in der Grenzregion des tropischen Regenwaldes und die gefangenen Moskitos auf Arboviren untersucht wurden, konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Von daher ist ein Vergleich der in dieser Studie gefundenen Virusprävalenz mit Daten aus anderen afrikanischen und südamerikanischen Studien schwierig. In einer Studie aus dem Senegal und Mauretanien konnten aus 2199 Moskitopools 236 Virusstämme isoliert (10,7 %) werden, die zu fünf verschiedenen Virusarten gehören (Diallo *et al.*, 2005). Eine besonders hohe Prävalenz, mit 56 Virusisolaten aus 51 Pools, von Arboviren wurde in Zecken aus Kenia gefunden (Sang *et al.*, 2006), von denen vier Viren nicht identifiziert werden konnten. In einer anderen Studie, bei der eine hohe Antikörperprävalenz gegen verschiedene Arboviren unter der Bevölkerung von Kamerun gefunden wurde, wird postuliert, dass inter-endemische Arbovirus-Infektionen sehr häufig auftreten (Kuniholm *et al.*, 2006). In Südamerika zirkulieren ebenfalls viele verschiedene Arboviren, die in der Vergangenheit vermehrt zu Epidemien geführt haben (Diaz *et al.*, 2006; Feres *et al.*, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2004). Im Amazonasgebiet von Peru konnten aus 539.694 gefangenen Moskitos, die in 15.000 Moskitopools zusammengefasst wurden, 164 Virusstämme (1,1 %) isoliert werden (Turell *et al.*, 2005). Die Probensammlung fand außerhalb von Epidemien unter der Bevölkerung statt und diese Studie zeigt die Vielfalt arboviraler Erreger im südamerikanischen Regenwald. Eine große Vielfalt an verschiedenen Viren in tropischen Gebieten konnte auch in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden und die Ergebnisse bestätigen die Daten der anderen Studien.

Im Gegensatz zur Situation in tropischen Regionen der Erde, treten in Europa keine durch

Arboviren verursachten großen Epidemien auf. Das einzige bekannte Arbovirus der Familie *Togaviridae* ist Sindbis Virus, welches in Nordeuropa vertreten ist. In Finnland wurde 1990 eine Antikörperprävalenz von 2-5 % unter der Bevölkerung gemessen (Lundstrom, 1999). Die meisten, der in Europa auftretenden Enzephalitis-Fälle werden durch Phleboviren verursacht, die durch Sandfliegen übertragen werden (Kallio-Kokko *et al.*, 2005), allerdings mit einem sporadischen und punktuellen Auftreten. Seit 1950 wurden im mediterranen Raum Europas auch vereinzelt West-Nil Virus Ausbrüche diagnostiziert, jedoch wurden bisher noch keine länger andauernden Epidemien beschrieben (Murgue *et al.*, 2002). Infektionen mit vektorassoziierten Erregern haben auch in Europa zugenommen (Kallio-Kokko *et al.*, 2005), aber die Lage ist bei Weitem nicht mit der in tropischen Ländern vergleichbar.

YFV, WNV und DENV-2 sind in Côte d'Ivoire endemisch (Cabre *et al.*, 2005; Cordellier *et al.*, 1983; Germain *et al.*, 1982; Cordellier, 1978) und es war zu erwarten, dass sich diese Viren in den Proben befinden. Somit wurde die aus allen Moskitopools extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben und für YFV, WNV, DENV1-4 und mit einer generischen Flavivirus PCR getestet. Jedoch konnte in keinem Pool eines dieser Flaviviren nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund, dass die Proben für WNV negativ waren, kann an einer generell sehr geringen WNV-Prävalenz in Côte d'Ivoire liegen. Zwar wurde in ivoirischen Pferden eine hohe Seroprävalenz von 28 % gegen WNV gefunden (Cabre *et al.*, 2005), jedoch wurde das Virus in Côte d'Ivoire bisher nur aus drei Moskitoarten und aus einer Zeckenart isoliert (www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/). Wie hoch die WNV Prävalenz der ivoirischen Moskitopopulation ist, ist nicht bekannt.

Eine mögliche Erklärung für die negativen PCR Ergebnisse bezüglich YFV und DENV könnte sein, dass die Probensammlung von Anfang Februar bis Ende Mai, also von Mitte bis Ende der Trockenzeit, statt fand. Optimale Bedingungen für eine Gelbfieber und Dengue Zirkulation sind zu Beginn der Regenzeit und von der zweiten Hälfte der Regenzeit bis zum Anfang der Trockenzeit (Russel *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.* 2001; Germain *et al.*, 1977, 1981; Cornet *et al.*, 1978, 1979; Cordellier 1978; Hervé *et al.*, 1977). In der Trockenzeit treten außerhalb des Waldes keine humanen YF Fälle auf (Cornet *et al.*, 1980). In der Regenzeit ist die Prävalenz von potentiellen Vektoren außerhalb des Waldes höher als innerhalb des Waldes (Cordellier, 1978). Im Regenwald sorgt der sylvatische Zyklus zwischen Vektoren und Affen für eine dauerhafte Präsenz von YF (Germain *et al.*, 1982), d.h. im Primärwald hätte auch in der Trockenzeit YF gefunden werden können. Gründe für die negativen Ergebnisse können einerseits eine Immunität unter der Affenpopulation sein (Coz *et al.*, 1977; Rosen und Gubler, 1974) oder andererseits auch durch die verwendeten Fallen bedingt

worden sein. Mit den in dieser Studie verwendeten Lichtfallen konnten keine und mit den *Gravid Traps* sehr wenige *Aedes*-Arten gefangen werden, was auf eine niedrige Prävalenz dieser Arten oder auf inädaquate Fallen zurückzuführen ist (s. 5.1).

Der in Westafrika verbreitete DENV-2 Subtyp wurde im Regenwald nur aus primatophilen *Aedes*-Moskitos isoliert (Cordellier *et al.*, 1983), die mit den verwendeten Fallen wahrscheinlich nicht angelockt wurden. Als weitere Hypothese wäre zu nennen, dass zur Zeit der Probensammlung keine Epidemien unter der humanen Bevölkerung aufgetreten sind, wobei einzelne Krankheitsfälle nicht auszuschließen sind, die auf eine Infektion mit diesen Erregern hätten schließen lassen können, was zur Folge hat, dass die für Flaviviren nötigen Amplifikatoren nicht vorhanden waren. Für DENV-2 sind sogenannte „stille Intervalle“ beschrieben, in denen zwischen 5 und 8 Jahren keine Epidemien auftreten (Diallo *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass mit den in dieser Arbeit gewählten Methoden Viren aus adulten Moskitos isoliert und charakterisiert werden können.

Als eine aussagekräftige Methode zur Untersuchung von Moskitos auf Viren hat sich die Inokulation von Moskitohomogaten in verschiedene Zellkultursysteme erwiesen. Die Induktion eines cytopathischen Effekts (CPE) kann als Hinweis auf ein replizierendes Virus gewertet werden. Eine Anzucht der Viren gelang nur auf den Insektenzellen C6/36, jedoch nicht auf den Vertebratenzellen Vero oder CEF. Von 437 in der Zellkultur untersuchten Pools zeigten 98 (22,4 %) einen CPE. Es konnten Virusstocks mit einem Titer von mindestens 10^6 Partikeln/ml hergestellt werden, so dass stichprobenartig 30 dieser Virusstocks der Zonen B bis F (Primärwald bis Dorf) elektronenmikroskopisch untersucht werden konnten. Die Elektronenmikroskopie dient durch den „offenen Blick“ als ein breites diagnostisches Werkzeug (Gentile und Gelderblom, 2005) und ermöglicht eine erste Klassifizierung aufgrund von morphologischen Merkmalen. Als sensitive und schnelle Methode zur Detektion bekannter Arboviren wird die RT-PCR verwendet (Kramer *et al.*, 2002; Jupp *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 1992), die eine genetische Einordnung von Viren ermöglicht. Sollen jedoch unbekannte Viren detektiert werden, kann eine PCR mit Random Primern durchgeführt werden, bei der virale Genomfragmente unspezifisch amplifiziert werden und durch Klonierung und Sequenzierung klassifiziert werden können (Stang *et al.*, 2005). Um die genetische Distanz verwandter Viren zu untersuchen, wird eine phylogentische Stammbaumanalyse durchgeführt (Thompson *et al.*, 1994). Durch den paarweisen Vergleich aller für den Stammbaum verwendeten Sequenzen und der Berechnung der genetischen Distanz, ist eine Einordnung von Isolaten möglich. Zwei Isolate des neu beschriebenen Tai

Forest Virus (TFV) konnten mit dieser Methode phylogenetisch in die Gruppe der durch Moskitos übertragenen Flaviviren eingeordnet werden.

5.2.1 Charakterisierung des Taï Forest Virus (TFV)

In einer neueren Studie, die auf phylogenetischen Daten basiert, wird vermutet, dass es noch ca. 2000 unklassifizierte Flaviviren gibt (Pybus *et al.*, 2002). In den letzten Jahren sind einige neue Flaviviren beschrieben worden (Cook *et al.*, 2006; Nisbet *et al.*, 2005; Crabtree *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2003), die belegen, dass das Wissen über Mitglieder der *Flaviviridae* weitaus noch nicht ausgeschöpft ist. Besonders das Vorkommen von neuen Varianten in abgelegenen Regenwaldgebieten macht deutlich, dass durch menschliches Eindringen in diese Gebiete und durch die Abholzung des Regenwaldes die Gefahr von Infektionen mit bisher unbekannten Virusvarianten besteht.

Aus zwei Pools (B3 und B31) aus dem Primärwald konnten zwei Viren mit 97 % Homologie zueinander in Zellkultur isoliert werden. Es wurden ca. 88 % des Gesamtgenoms sequenziert, welches außer einer entfernten Verwandtschaft zu durch Mosquito übertragenen Flaviviren keinerlei Homologien zu in den öffentlichen Datenbanken verfügbaren Sequenzen aufwies. Zu den für Côte d'Ivoire beschriebenen Flaviviren (s. Tab. 1) zeigt TFV keine nähere Verwandtschaft als zu anderen Flaviviren. Die 3 % Unterschied der beiden Isolate sind vergleichbar mit unterschiedlichen Genotypen von DENV und von YFV (Mackenzie *et al.*, 2004), was bestätigt, dass beide Isolate eng miteinander verwandt sind. Das RNA-Genom und die morphologischen Merkmale zeigen ebenfalls Charakteristika von Flaviviren. Da sie zu keinem bekannten Flavivirus näher verwandt sind, wird angenommen, dass es sich hierbei um eine neue Gruppe innerhalb der *Flaviviridae* handelt. Die Viren wurden als Taï Forest Virus B3 und Taï Forest Virus B31 bezeichnet.

Moskitos der Art *Uranotaenia mashoaensis*, eine sehr kleine, nachtaktive Mosquitoart, sind nicht als wichtige arbovirale Vektoren bekannt. In einem Fall wurde Wesselsbron Virus in Senegal aus dieser Art isoliert (Publications des scientifiques de l'IRD, www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/). Wesselsbron Virus wurde ebenfalls im Primärwald des Taï Nationalparks gefunden, dort wurde das Virus aber aus zwei *Aedes*-Moskitos isoliert (www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/). Beide TFV Stämme konnten aus *Uranotaenia mashoaensis* Moskitos isoliert werden. Die Isolation eines neuen Flavivirus aus dieser Art lässt vermuten, dass auch diese Moskitos in der Lage sind Viren zu übertragen.

Die Moskitos wurden in 1 m und in 24 m Höhe über dem Waldboden im Primärwald gefangen. Die höchste Dichte von *Uranotaenia mashoaensis* lag zwischen 1 m und 8 m über dem Waldboden, aber auch aus in 24 m Höhe gefangenen Moskitos dieser Spezies konnte

TFV isoliert werden, was zeigt, dass TFV in unterschiedlichen Stratifikaten präsent ist.

Ob TFV für Primaten des Tai Nationalparks oder für die Bevölkerung der Region pathogen ist, bleibt noch zu klären. Eine Anzucht des Erregers ist bisher nur auf Insektenzellen aber nicht auf Vertebratenzellen möglich gewesen.

Die einzigen bisher bekannten Insektenflaviviren sind Cell-Fusing-Agent Virus (CFAV; Harbach, 1988; Stollar und Thomas, 1975), Kamiti River Virus (KRV; Crabtree *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2003) und das erst vor kurzem entdeckte Culex Flavivirus (CxFV; Hoshino *et al.*, 2007). Zu den ersten beiden Isolaten zeigt TFV im phylogenetischen Stammbaum von allen Flaviviren die geringste Verwandtschaft. CFAV und KRV haben sich sehr früh von allen bekannten Flaviviren abgespalten und der *bootstrap*-Wert für die Verzweigung zwischen CFAV und KRV und den restlichen bekannten Flaviviren zeigt eine hohe Signifikanz.

Zur Untersuchung des Pathopotentials von TFV sollen Studien zur Seroprävalenz unter der Bevölkerung und der Primatenpopulation durchgeführt werden.

5.2.2 Untersuchungen zu dem bunyavirus-ähnlichen und eines unklassifizierten Virusisolats

Aus den homogenisierten Moskitoköpfen von Pool F23 gelang die Anzucht von mindestens zwei verschiedenen Viren auf C6/36 Zellen. Dabei handelt es sich um ein unhülltes (F23-K4) und um ein behülltes, bunyavirus-ähnliches (F23-K1 und F23-K19) Virus.

Die Familie der *Bunyaviridae* ist eine der größten Virusfamilien mit über 330 Mitgliedern (Nichol, 2001; Elliott *et al.*, 2000). Das Genus der Bunyaviren umfasst eine extrem diverse Gruppe an durch Moskitos übertragenen Viren, die in den meisten Fällen nur serologisch klassifiziert sind (Karabatsos, 1985). Eine genetische Charakterisierung ist auf wenige Viren beschränkt. Von der bunyavirus-ähnlichen Viruskomponente aus diesem Pool (F23-K1) wurde ein 3,579 kb großes Genomfragment sequenziert, dass auf Aminosäureebene ca. 30 % Homologie zur RNA-Polymerase von Sandfly-Fever Virus, Rift-Valley-Fever Virus und Uukuniemi Virus zeigte, die alle zum Genus Phlebovirus der *Bunyaviridae* gehören. Die 609 bp lange Sequenz von F23-K19 zeigte auf Aminosäureebene Verwandtschaft zum Nukleokapsidprotein von Sandfly-Fever Virus. Die geringe Verwandtschaft von F23-K1 und F23-K19 zu anderen Bunyaviren könnte an der limitierten Anzahl zur Verfügung stehender Sequenzen von Bunyaviren liegen. Die hohe Diversität der bekannten Virusisolate zeigt wie variabel das Genom von Bunyaviren ist.

Der virushaltige Zellkulturüberstand des Pools F23 zeigte vor der Ätherbehandlung unter dem Elektronenmikroskop bunyavirus-ähnliche Partikel, welche nach der Ätherbehandlung nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Ebenso waren nach Ätherbehandlung die

Genomsequenzen F23-K1 und F23-K19 nicht mehr nachzuweisen, jedoch die Sequenz, die durch F23-K4 definiert ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass aus dem Pool F23 ein unbehülltes und ein behülltes Virus isoliert wurden.

F23-K1 und F23-K19 wiesen Sequenzhomologien zu zwei unterschiedlichen Segmenten von Bunyaviren auf, daher ist es nahe liegend, dass beide nachgewiesenen Genomfragmente zu den im Elektronenmikroskop dargestellten bunyavirus-artigen Partikeln gehören. Aufgrund der genetischen Verwandtschaft von F23-K1 und F23-K19, dem ähnlichen Verlauf der Wachstumskurven und der Äthersensitivität, könnte es sich bei F23-K19 um das für das Nukleokapsidprotein von F23-K1 codierende Gensegment handeln.

Von dem unbehüllten Isolat F23-K4 wurde eine 1,506 kb lange Genomsequenz generiert, welche ca. 30 % Homologie auf Aminosäure Ebene zum Polymerasegen von Oropouche Virus und Bunyamvera Virus aufwies, die beide zum Genus Bunyavirus gehören. Während Oropouche Virus in Südamerika vorkommt (Watts *et al.*, 1997; Tesh, 1994), wurde Bunyamvera Virus in vielen afrikanischen Ländern detektiert (Traore-Lamizana *et al.*, 2001; Rodhain *et al.*, 1989). Antikörper wurden auch unter der ivoirischen Bevölkerung gefunden (Robin *et al.*, 1968). Zwar wies F23-K4 auf Aminosäureebene geringe Homologien zu Bunyaviren, die für Côte d'Ivoire beschrieben sind, auf, jedoch zeigt das Virus keine Äthersensitivität und besitzt somit nicht die für Bunyaviren charakteristische Lipidhülle. Die Verwandtschaft wurde zwar zur RNA-Polymerase von Bunyaviren gefunden, aber Polymerasen sind häufig konserviert und weisen untereinander daher Homologien auf. Es kann daher postuliert werden, dass der Sequenzabschnitt von F23-K4 zu einem bisher unbekannten Virus gehört. Zu vermerken ist jedoch, dass unbehüllte, einzelsträngige RNA-Viren mit negativer Strangorientierung bisher nicht bekannt sind. Dieser Befund ist daher von besonderem Interesse, da mit dem neuen Isolat möglicherweise eine neue Virusfamilie identifiziert wurde.

Bei der Virusanzucht aus Homogenaten in der Zellkultur kann es vorkommen, dass mehrere in der Probe vorhandene Viren angezüchtet werden. Zur Trennung kann der Plaque-Test eingesetzt werden, indem einzelne Plaques zur Infektion von frischen Kulturen genutzt und die Viren somit vereinzelt werden. Voraussetzung für die Trennung ist, dass beide Viren einen CPE im Zellrasen verursachen. Da die Viren auf C6/36 Zellen angezüchtet wurden, welche keinen zusammenhängenden Zellrasen ausbilden und einzelne Plaques nicht sichtbar sind, war diese Methode zur Virentrennung nicht möglich. Aufgrund der unterschiedlichen Äthersensitivität der Viren aus Pool F23, konnte F23-K4 abgetrennt und somit gezeigt werden, dass in diesem Moskitopool mindestens zwei verschiedene Viren

vorliegen. Bei der Untersuchung von Zellkulturüberständen von Anzuchtversuchen, die einen CPE gezeigt hatten, wurden alle drei Fragmente häufig nachgewiesen, d.h. die durch Pool F23 definierten Viren kamen relativ häufig vor und wurden daher aus verschiedenen Pools mehrfach angezüchtet. Das Auftreten F23-K1 und -K19, bzw. nur von F23-K4 in Anzuchtversuchen, unterstützt die Hypothese, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Viren handelt. Jedoch wurden in drei Überständen nur F23-K4 und F23-K19 und in einem Überstand F23-K1 alleine nachgewiesen. In zwei Fällen waren die Kopienzahlen von F23-K4 und F23-K19 zwischen 1×10^2 und 1×10^1 , so dass F23-K1 aufgrund von niedriger Konzentration möglicherweise nicht detektiert wurde. Bei den anderen beiden Anzuchten kann die Abwesenheit von einem Genomfragment nicht an einer zu niedrigen Konzentration gelegen haben. Eine mögliche Erklärung könnten Basenpaaraustausche in der Primer-, bzw. Sondenbindungsstelle einiger Isolate sein, so dass diese Überstände fälschlich negativ auf ein Genomfragment getestet wurden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die drei Genomfragmente zu drei verschiedenen Viren gehören. Um diese Frage zu beantworten, sind weitere elektronenmikroskopische und molekulargenetische Untersuchungen dieser vier Pools notwendig.

Zur Bestimmung des Wirtspotentials, sowie um die aus Pool F23 angezüchteten Viren taxonomisch in eine Virusfamilie einordnen zu können, sind weitere grundlegende Untersuchungen zur Viruscharakterisierung erforderlich.

5.2.3 Versuche zur Charakterisierung des Orbivirus-Isolats

Aus dem Pool B14 wurde ein Virus isoliert, das morphologisch zu den Orbiviren in der Familie der Reoviren eingewordnet werden konnte.

Die genetische Diversität innerhalb der Orbiviren ist hoch, denn homologe Proteinsequenzen von Orbiviren, die durch Moskitos oder durch Zecken übertragen werden, besitzen nur 23 % bis 38 % Aminosäurehomologie (Atoui *et al.*, 2005). Dies könnte erklären, warum die aus Pool B14 generierten Sequenzen keine Verwandtschaft zu anderen Viren der Familie *Reoviridae* gezeigt haben. Einige der klonierten Sequenzen wiesen Homologien zu Viren und gleichzeitig zu Plasmodien oder zu Moskitos auf. Da auch hier die homologen Sequenzbereiche sehr kurz waren, ist die Herkunft solcher Sequenzen nicht mit Sicherheit zu bestimmen.

Das Genom von Reoviren ist zwischen 20 und 23 kb groß. Die Größe von 26 kb der durch Klonierung von PCR-Produkten erhaltenen Sequenzen lassen vermuten, dass es sich um ein Sequenzgemisch aus unter anderem bisher unbekannten Reovirussequenzen, Zellkultursequenzen und Plasmodiensequenzen, handelt. Eine weitere Hypothese wäre,

dass auch in diesem Pool eine Doppelinfektion mit zwei verschiedenen Viren vorliegt, wie es auch bei anderen Isolationsversuchen zu beobachten war. Es wurden über sehr kurze Sequenzbereiche zwischen 20 und 30 Nukleotiden Homologien zu sechs verschiedenen Virusfamilien gefunden. Während zu fünf Virusfamilien nie mehr als höchstens drei Klone Verwandtschaft zeigten, wiesen 16 Sequenzen Homologien zu unterschiedlichen Alphaviren der *Togaviridae* auf. Dies kann bedeuten, dass zusätzlich zu der Infektion mit Orbiviren auch noch ein Togavirus isoliert wurde. Togaviren sind umhüllt und besitzen ein Genom aus einzelsträngiger, unsegmentierter, RNA in Plus-Polarität. Nach der Ätherbehandlung des Überstandes war jedoch keine Verringerung des Virustiters zu messen, d.h. dass Togaviren nur einen in der Titration nicht erfassbaren Anteil des CPE-verursachenden Virus ausmachten. Auch die für Togaviren negativen Ergebnisse in der Elektronenmikroskopie lassen einen niedrigen Titer vermuten.

Orbiviren besitzen 10 Segmente, jedoch konnten nach Aufreinigung der Viruspartikel nur fünf auf einem Agarosegel dargestellt werden. Möglicherweise wurden einige der Sequenzen nicht aufgetrennt, weil sie ähnliche Größen aufweisen oder die Konzentration an viraler Nukleinsäure war nicht ausreichend, um vor allem kleine Fragmente sichtbar machen zu können. Es wäre auch denkbar, dass es sich um ein neues Isolat mit einem segmentierten Genom aus fünf Segmenten handelt.

Zur weiteren Charakterisierung des Virus sind genauere Informationen über das Genom unerlässlich. Hier bietet sich an, die Genomsegmente aus Gelen zu eluieren und mit für Reoviren speziell etablierten Amplifikationsmethoden die einzelnen Genome zu amplifizieren und zu sequenzieren. Um die Prävalenz in den sechs untersuchten Habitaten und in den Moskitospezies abzuschätzen, können auf den durch die Sequenzierung gewonnenen Erkenntnissen, ein spezifisches Nachweissystem etabliert und für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

5.2.4 Untersuchungen des coronavirus-ähnlichen Virusisolats

Coronaviren kommen weltweit vor und sind aus vielen verschiedenen Organismen isoliert worden (Tang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2003). Für Coronaviren war bis vor kurzem nicht bekannt, dass sie auch als Zoonose von Tieren auf Menschen übertragen werden können. Jedoch wird für SARS-CoV ein tierisches Reservoir vermutet (Li *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2003; Martina *et al.*, 2003). Es ist bisher nicht bekannt, dass Coronaviren in Moskitos replizieren oder durch diese übertragen werden. Sollte es sich bei dem vorliegenden Isolat tatsächlich um ein Coronavirus handeln, so wäre dies ein neues und unerwartetes Ergebnis.

Die mit dem Homogenat von Pool F24 infizierten C6/36 Zellen zeigten schon nach 2 dpi einen stark ausgeprägten CPE. Im Elektronenmikroskop konnten im Überstand der infizierten Zellkultur ca. 10^{10} Partikel/ml, die Ähnlichkeit mit Coronaviren besitzen, detektiert werden. Aufgrund der Morphologie der Partikel war eine Untersuchung auf Coronaviren nahe liegend. Jedoch blieben auch die durchgeführten PCRs sowohl mit verschiedenen spezifischen als auch mit generischen Primern für Coronaviren erfolglos. Sequenzvariationen könnten bei dem vorliegenden Isolat aus Pool F24 die Ursache sein, dass eine Amplifikation mit generischen Coronaprimern nicht möglich war. HCoV-NL63 gehört zur Gruppe der 1 Coronaviren und besitzt zu HCoV-229E, dem nächsten verwandten Virus, allerdings nur 65 % Sequenzidentität (Hoek *et al.*, 2004; Pyrc *et al.*, 2004). Zusätzlich unterscheiden sich diese beiden Viren in einigen Details im Genomaufbau. Von daher war es nicht möglich HCoV-NL63 mit einer zur Erfassung von allen Coronaviren etablierten RT-PCR (Stephensen *et al.*, 1999) zu amplifizieren.

Der Titer der Zellkultur betrug zwischen 10^8 und 10^9 TCID₅₀/ml, doch trotz des hohen infektiösen Titers war es nicht möglich durch eine durch *Random Priming* erzielte Amplifikation viraler Genomfragmente aus virushaltigem Zellkulturüberstand Sequenzen mit Verwandtschaft zu Viren zu generieren. Dies war überraschend, da durch die anderen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Studie durchgeführt wurden, virale Sequenzen amplifiziert und kloniert werden konnten. Durch eine nachfolgende Sequenzierung und einen Sequenzvergleich mit der öffentlichen Datenbank war eine vorläufige Einordnung der Viren möglich. Als Ursache für das Fehlschlagen werden Sekundärstrukturen der RNA vermutet, die eine Anlagerung der Primer und eine cDNA Synthese verhinderten. Diese Sekundärstrukturen könnten auch dazu beigetragen haben, dass eine Amplifikation mit Coronavirus spezifischen Primern nicht möglich war.

Entweder handelt es sich bei dem vorliegenden Isolat um ein Virus mit Coronavirus ähnlicher Morphologie oder um eine unbekannte Coronavirus Variante, die in Moskitos repliziert. Auch hier sind weitere Untersuchungen zur Einordnung und Prävalenz nötig.

5.2.5 Untersuchungen zur Charakterisierung der Rhabdovirusisolate

Als Überträger von Rhabdoviren sind *Culex*-Moskitos beschrieben (Bourhy *et al.*, 2005). Das einzige für Côte d'Ivoire beschriebene Rhabdovirus (Nkolbisson Virus) wurde aus verschiedenen *Aedes*-Arten isoliert (www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/). Die Viren der vorliegenden Arbeit stammen zum einen aus *Culex decens* Moskitos (Pool C23) und zum anderen aus *Culex*-Moskitos, die bis zum Subgenus bestimmt wurden (*x55*, *Culex Eum. spp.*, Pool D24). Somit konnten Rhabdoviren erstmals auch in westafrikanischen *Culex*-Moskitos

nachgewiesen werden.

Phylogenetische Verwandtschaftsanalysen innerhalb der Familie der *Rhabdoviridae* sind schwierig durchzuführen, da die genetische Diversität sehr hoch ist (Kuzmin *et al.*, 2006; Bourhy *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurden zwei neue Rhabdoviren beschrieben, die nur zwischen 24,6 % und 43,2 % Homologie zu bekannten Rhabdoviren zeigten (Diniz *et al.*, 2006). Das aus dem Zellkulturüberstand von Pool C23 isolierte Virus zeigte Homologien zu Rhabdoviren der *Dimarhabdovirus Supergroup* und zu Rhabdoviren des Genus *Vesiculovirus*. Das Virusisolat von Pool D24 zeigte Verwandtschaft zu Rhabdoviren der Genera *Vesiculovirus* und *Ephemerovirus*. Die hohe genetische Variabilität in der Familie der *Rhabdoviridae* begründet möglicherweise die geringen Homologien der aus den Zellkulturüberständen von den Pools C23 und D24 amplifizierten Sequenzen zu anderen Rhabdoviren.

Neben den Hinweisen auf Rhabdoviren wurden aus Pool C23 Sequenzinformationen gewonnen, die auf Nukleotid-, als auch auf Aminosäureebene Homologien zu Arthropodenflaviviren, wie zu dem *Culex* Flavivirus (CxFV), Kamiti-River Virus (KRV) und Cell-Fusing-Agent Virus (CFAV) aufwiesen, welche eng miteinander verwandt sind. CFAV, welches aus einer *Aedes aegypti* Zellkultur isoliert wurde, gehört zur Familie der *Flaviviridae* und wurde als Insektenflavivirus klassifiziert (Stollar and Thomas, 1975). Dieses Virus verursacht, wie der Name schon besagt, eine Fusionierung von infizierten Zellen und führt zur Synzitenbildung (Stollar and Thomas, 1975). Erst in der jüngsten Vergangenheit konnten zu CFAV verwandte Viren, wie KRV und CxFV, in Moskitopopulationen gefunden werden (Hoshino *et al.*, 2007; Cook *et al.*, 2006; Crabtree *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2003). Diese Viren wurden vorwiegend aus verschiedenen *Aedes*-Moskitos (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. macintoshi*) isoliert, aber auch in *Culex* spp. gefunden, wie auch die Isolate aus Pool C23 und D24. Die mit dem Homogenat aus Moskitoköpfen der Pools C23 und D24 infizierten Zellen zeigten drei bis fünf Tage nach der Infektion eine massive Synzitenbildung. Dieser CPE wird eventuell nicht durch die elektronenmikroskopisch detektierten Rhabdoviren, sondern durch zu CFAV verwandte Viren ausgelöst. Dies würde bedeuten, dass in beiden Moskitopools eine Doppelinfektion mit Rhabdoviren und Flaviviren vorliegt. Zusätzlich wurde der Zellkulturüberstand Pool C23 positiv auf F23-K4 und F23-K19 getestet, was bedeutet, dass eine Drei-, bzw. Vierfachinfektion in Pool C23 vorliegt. Möglicherweise haben die Rhabdoviren das Wachstum der Erreger aus Pool F23 gehemmt, denn die gemessenen Kopienzahlen von F23-K4 und F23-K19 waren sehr niedrig. Außerdem konnte F23-K1 nicht nachgewiesen werden, was ebenfalls für eine Hemmung des Wachstums der bunyavirus-ähnlichen Erreger durch die Rhabdoviren spricht.

Von Interesse ist die Gewinnung von mehr Sequenzinformation zur Klassifizierung der isolierten und morphologisch charakterisierten Rhabdoviren und der Nachweis, ob in beiden Kulturen eine Infektion mit einem CFAV verwandten Virus vorliegt. Zusätzlich ist die Untersuchung der Prävalenz beider Isolate in den unterschiedlichen Habitaten von Interesse.

5.2.6 Erregerdichte der isolierten Viren in den verschiedenen Zonen

Für diese Arbeit war es von Interesse die Verbreitung verschiedener Viren in ökologisch unterschiedlichen Zonen zu untersuchen und eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich eine Habitatveränderung auch auf die Virendiversität und/oder Virusprävalenz, unter anderm bedingt durch Änderungen in der Moskitopopulation, auswirkt. Da alle in dieser Arbeit gefundenen Viren bisher unbekannte Isolate darstellen und erst spezifische Nachweissysteme etabliert werden mussten, war es nur in Einzelfällen möglich für die detektierten Erreger Nachweissysteme zu entwickeln, um die Prävalenz in den Moskitopools zu untersuchen.

Exemplarisch wurde gezeigt, dass zumindest einzelne Viren weit verbreitet sind. So wurden, die durch Pool F23 (F23-K1, F23-K4 und F23-K19) definierten Erreger in 35 Pools unterschiedlicher Mosquitoarten und in allen Habitaten gefunden. Betrachtet man die Verteilung der aus Pool F23 isolierten Viren, so zeigt sich, dass die Prävalenz an den Camps (Zone A), im Sekundärwald (Zone C) und im Dorf (Zone F) am höchsten ist. Im Dorf sind doppelt so viele Überstände der Zellkultur positiv auf diese Viren getestet worden wie Zellkulturüberstände der Camps und des Sekundärwalds. Die Prävalenz positiver Kulturen betrug in den Plantagen 1/3, im Primärwald 1/6 und in den Feldern 1/10 der im Dorf gemessenen Prävalenz. Die aus Pool F23 isolierten Viren konnten aus drei verschiedenen Genera (*Culex*, *Uranotaenia* und *Anopheles*) und aus mindestens zehn verschiedenen Arten isoliert werden, wobei die Präferenz deutlich bei *Culex nebulosus* lag. Als mögliche Ursache der hohen Prävalenz der bunavirus-ähnlichen Erreger aus Pool F23, wäre die transovarielle Übertragung des Erregers von infizierten Moskitos auf die Nachkommen zu nennen. Daten zur transovariellen Übertragung von Viren verschiedener Virusfamilien zeigen, dass Bunyaviren mit einer hohen Übertragungsrate auf die Nachkommen (15-40 %) übertragen werden (Schopen *et al.*, 1991; Tesh, 1980). Um zu untersuchen, ob die Erreger aus Pool F23 transovariell übertragen werden, ist ein Testen der auch in dieser Studie gefangenen männlichen Moskitos auf diese Viren von großem Interesse.

Die aus Pool F23 isolierten Viren besitzen durch ihre Anpassungsfähigkeit von verschiedenen Moskitospezies bis hin zu unterschiedlichen Genera und die Möglichkeit der vermuteten transovariellen Übertragung das Potential sich sehr leicht ausbreiten zu können,

was für die sechs ökologisch verschiedenen Gebiete gezeigt werden konnte. Die Verbreitung dieser Erreger über die untersuchten Gebiete hinaus ist anzunehmen. Die Untersuchung der Prävalenz dieser Viren macht deutlich wie leicht sich anpassungsfähige Viren in unterschiedlichen Habitaten ausbreiten können.

Das Flavivirus-verwandte Taï Forest Virus (TFV) wurde hingegen nur in zwei Zellkulturüberständen der gleichen Moskitoart (*Uranotaenia mashaensis*) aus dem Primärwald (Zone B) isoliert. Dieser Erreger zeigt in den untersuchten Proben eine hohe Spezifität für eine bestimmte Moskitoart, welche im Primärwald (Zone B) die größte Populationsdichte aufweist. Im Sekundärwald (Zone C), den Plantagen (Zone D), Feldern (Zone E) und im Dorf (Zone F) konnten nur einige Moskitos dieser Art gefunden werden. Dies könnte die Abwesenheit des Erregers in den anderen untersuchten Zonen erklären. Als weitere Erklärung ist die niedrige transovarielle Übertragungsrate zu nennen, die bei Flaviviren zwischen 1 % und 3 % liegt (Joshi *et al.*, 2002; Tesh, 1980; Rosen *et al.*, 1980). Bedingt durch die niedrige vertikale Übertragungsrate bei Flaviviren sind Vertebraten als Amplifikatoren nötig, um eine Infektion in einer Population über längere Zeit aufrechterhalten zu können. Auch für TFV besteht das Potential der Ausbreitung über die Grenzen des Primärregenwaldes hinaus, da die Vektoren in allen sechs Zonen gefangen werden konnten.

Aus den bisher gewonnenen virologischen Daten ist keine Aussage über die endemische Bedeutung der gefundenen Viren ableitbar. Sie bieten jedoch die Grundlage für die Entwicklung spezifischer molekularer und serologischer Methoden, mit denen dann gezielt nach der Bedeutung dieser Erreger als mögliche Krankheitserreger geforscht werden kann.

5.3 Relevanz der Ergebnisse

Die Analyse der exogenen Faktoren auf den Einfluss der Prävalenz von Arboviren und deren Vektoren hat deutlich gemacht, dass sich die massiven ökologischen und klimatischen Veränderungen, die durch den Vergleich der Daten der sechs ökologisch verschiedenen Zonen ein indirektes Vorher-Nachher Bild wiedergeben, auf die Zusammensetzung der Moskitopopulation ausgewirkt haben. Somit unterstützen diese Ergebnisse die Befunde anderer Studien (Matthys *et al.*, 2006; Courturier *et al.*, 1984; Cordellier und Akoliba, 1981; Laveissière und Kiéno, 1979). Die Charakterisierung von sechs Virusisolaten aus fünf verschiedenen Zonen zeigte, dass alle untersuchten Viren neue Varianten bekannter Erreger oder sogar Viren mit bisher unbekannten Eigenschaften darstellen.

Für Côte d'Ivoire wurden bisher 45 Viren beschrieben, von denen insgesamt 533

verschiedene Isolate gewonnen werden konnten (www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/). Von 31 dieser Viren wurden im gesamten Zeitraum der sogenannten CRORA Studie von 1962 bis 2001 unter fünf Isolate pro Virus gefunden, was auf eine Durchseuchung des Landes mit vielen unterschiedlichen Viren hindeutet, von denen nur wenige eine hohe Prävalenz aufweisen und teilweise Epidemien ausgelöst haben (Gelbfieber, Chikungunya, Zika, Dengue-2). Bei der Betrachtung der im Taï Nationalpark gefundenen Viren wird ebenfalls deutlich, dass diese Region viele verschiedene Viren beherbergt. So konnte aus männlichen *Aedes*-Moskitos, die in 24 m Höhe gefangen wurden, Orungo Virus isoliert werden (Cordellier *et al.*, 1982) und es wurden zwei Virusstämme (Taï Virus) gefunden, die nicht klassifiziert werden konnten, aber Ähnlichkeit zu Bunyaviren aufweisen (www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/). Eines dieser Isolate stammt aus *Culex nebulosus*, der gleichen Art aus der auch das bunyavirus-ähnliche Isolat und das unklassifizierte Virus aus Pool F23 stammen. Die Verwandtschaft dieser beiden Isolate zu untersuchen, wäre aufschlussreich.

Bei dem Großteil der in der CRORA Studie gefundenen Viren ist nicht bekannt, ob sie ein humanpathogenes Potential besitzen, da nur vereinzelt Virusisolate aus Menschen gewonnen oder Antikörper gegen diese Erreger gefunden werden konnten. Inwiefern TFV und die Virusisolate aus den Pools B14, C23, D24, F23 und F24 humanpathogen sind, kann beim derzeitigen Forschungsstand noch nicht gesagt werden. Die Replikation dieser verschiedenen Viren konnte auf C6/36 Zellen nachgewiesen werden, schlug aber bei den verwendeten Primatenzelllinien fehl. Es ist derzeit daher noch unklar, ob es sich hier tatsächlich um Arboviren handelt, die von Insekten auf andere Wirte übertragen werden oder ob es sich teilweise um Mosquito-spezifische Viren handelt. Es konnte jedoch für eine Vielzahl von Arboviren gezeigt werden, dass sie in der Lage sind Menschen, bzw. neugeborenen Mäuse zu infizieren, aber nicht in Säugetierzelllinien replizieren (Diniz *et al.*, 2006). Banna Virus (BAV), was zur Familie der *Reoviridae* gehört, wurde sowohl aus an Enzephalitis erkrankten Menschen in verschiedenen Provinzen in China (Chen und Tao, 1996; Liting *et al.*, 1995) und Indonesien (Brown *et al.*, 1993), als auch aus Moskitos (Chen und Tao, 1996; Liting *et al.*, 1995), isoliert. BAV repliziert jedoch nicht in Säugetierzellen, sondern nur in Insektenzellen. Demzufolge könnte zumindest auch ein Teil der in dieser Studie gefundenen Viren humanpathogen sein. Serologische Untersuchungen unter der humanen Bevölkerung und gegebenenfalls bei Tieren könnten helfen diese Frage zu beantworten.

Der Anteil positiver Pools mit 22,4 % ist im Vergleich zu anderen Screenings mit 12,7 % (Cook *et al.*, 2006) und 1,7 % (Sang *et al.*, 2003) relativ hoch. Geht man jedoch von der Anzahl

an eingesetzten Moskitos aus und nimmt an, dass in jedem Pool nur ein Virus-positiver Mosquito vorhanden war, so liegt diese Studie mit 1,4 % Virus-tragender Moskitos im Vergleich zu den anderen mit 4,2 % und 0,05 % im Mittelfeld.

Erstaunlich ist, dass keine für Westafrika beschriebenen Viren und auch keine Varianten bereits bekannter Viren, sondern völlig neue Viren gefunden wurden (Cabre *et al.*, 2005, Cordellier *et al.*, 1983). Allerdings war die Anzahl der potentiell virus-positiven Pools so groß, dass aus Zeitgründen über die Hälfte der Pools (59 %), die einen CPE in der Zellkultur verursacht haben, bisher noch nicht näher untersucht werden konnten. Da diese Proben aber bereits auf WNV, YFV und DENV 1-4 und mit einer generischen Flaviviren PCR getestet wurden, ist nicht von einer Infektion mit diesen Erregern auszugehen. Ob eine Infektion mit Chikungunya, Zika, Orungo Virus oder anderen für Côte d'Ivoire beschriebenen Erregern vorliegt, muss noch untersucht werden. Die noch zu untersuchenden Proben unterscheiden sich nicht grundsätzlich in Herkunft und Zusammensetzung von den bereits untersuchten Proben und auch hier ist höchstens in Einzelfällen das Auftreten eines bereits bekannten Virus zu erwarten. Es ist nahe liegend, dass es sich bei dem Großteil der enthaltenen Viren ebenfalls um neue Viren handeln wird.

Die gewonnenen Daten legen nahe, dass gerade in Grenzgebieten des tropischen Regenwaldes zu Agrarflächen und Dörfern die Gefahr besteht, dass Viren auf andere Wirte und Vektoren, die an die vorliegenden Umweltbedingungen angepasst sind, übertragen werden könnten. Das Risiko, dass solche Wirtswechsel mit sich bringen können, lässt sich auf Grund der vorliegenden Daten für die hier beschriebenen Viren nur sehr schwer abschätzen. Verschiedene Beispiele aus der Vergangenheit, wie z.B. die Ausbreitung von HIV, dem SARS-CoV oder verschiedenen pandemischen Influenzaviren, haben gezeigt wie groß das Risikopotential für die menschliche Bevölkerung durch die Einschleppung von bisher unbekannten Viren sein kann (Lashley, 2006; Palese, 2006; Bell, 2004). Die Wahrnehmung solcher Risiken ist der erste Schritt zur frühzeitigen Entwicklung von geeigneten Abwehrmaßnahmen.

5.4 Ausblick

Um einen Gesamtüberblick über die vorkommenden Viren in der Region des Tai Nationalparks zu bekommen, ist die Bestimmung der Viren in den restlichen Pools (59 %), die einen CPE in der Zellkultur verursacht haben, von grossem Interesse. Gegebenenfalls können weitere neue Viren so weit charakterisiert werden, dass eine Einordnung dieser

Erreger in Virusfamilien möglich ist. Dies würde eine Abschätzung ermöglichen, wie hoch die Prävalenz von bekannten und von bisher unbekannten Viren ist. Außerdem ist der Aufbau eines spezifischen Nachweissystems für jeden identifizierten Erreger wichtig, um alle Moskitopools auf jeden gefundenen Erreger hin zu untersuchen und eine Aussage über die Verteilung innerhalb der Moskitospezies und der verschiedenen Habitate treffen zu können.

Weiterhin ist bei den unbekannten Viren Wissen über das Wirtsspektrum nötig, um das Risikopotential für Menschen und nichtmenschliche Primaten in Grenzgebieten des Regenwaldes beurteilen zu können. Das Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie und das Robert Koch-Institut verfügen über Blutroben der Bevölkerung aus den umliegenden Dörfern des Taï Nationalparks. Außerdem sind Blutproben von verschiedenen in Narkose gelegten Affenarten und von verstorbenen Schimpansen des Nationalparks vorhanden. Falls die gefundenen Erreger in der Lage sind menschliche und nichtmenschliche Primaten zu infizieren, sollte ein Antikörper-Screening dieser Proben auf diese Erreger Aufschluss über das Wirtsspektrum geben können. Hierbei wäre nur ein positives Ergebnis aussagekräftig, da bei einer niedrigen Prävalenz dieser Erreger in den Primaten alle Proben negativ getestet werden könnten. In einem weiteren Ansatz wäre eine Inokulation der isolierten Erreger in Mäuseembryonen hilfreich. Diese Methode wird üblicherweise eingesetzt, um das Pathopotential von aus Moskitos isolierten Viren abschätzen zu können.

Innerhalb des Zeitraums der Probensammlung wurden außerdem noch Bremsen in allen sechs Zonen und Blut- und Milzproben von Mäusen in den Zonen außerhalb des Nationalparks gesammelt. Der Zeitraum dieser Arbeit reichte nicht aus, um diese Proben auf potentielle Erreger zu untersuchen. Nagetiere sind in vielen Fällen ein Reservoir für Arboviren und Bremsen der Überfamilie *Tabanidae* gelten als Überträger vieler Krankheiten, wie z.B. Milzbrand, Weilscher Krankheit, Tularämie und Lyme-Borreliose, auf den Menschen (Martins-Neto *et al.*, 2003). Eine Untersuchung dieser Proben wäre somit im Forschungsinteresse dieser Arbeit und würde einen besseren Gesamtüberblick verschaffen.

Die Untersuchung von Proben aus dem Taï Nationalpark in Côte d'Ivoire hat gezeigt, dass das System der Probensammlung, Untersuchung von Moskitos als Vektoren und die Isolierung von neuen Viren verwendet werden kann. Des Weiteren wurden in dieser Studie nur neue Viren gefunden, was zeigt, dass die virale Diversität in tropischen Gebieten bei weitem noch nicht bekannt ist. Für die Einschätzung der globalen Situation in solchen tropischen Grenzregionen wäre es von Interesse, in anderen tropischen Regenwäldern der Erde, ähnliche Untersuchungen durchzuführen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdo-Salem, S., G. Gerbier, P. Bonnet, M. Al-Qadasi, A. Tran, E. Thiry, G. Al-Eryni, and F. Roger.** 2006. Descriptive and spatial epidemiology of rift valley Fever outbreak in yemen 2000-2001. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1081**:240-242.
- Aké Assi, L. and P. Pfeffer.** 1975. Parc National de Tai, Inventaire de la flore et de la faune. BDPA, Paris.
- Akoua-Koffi, C., S. Diarrassouba, V. B. Benie, J. M. Ngbichi, T. Bozoua, A. Bosson, V. Akran, P. Carnevale, and A. Ehouman.** 2001. [Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Cote d'Ivoire in 1999]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **94**:227-230.
- Anderson, C. R., L. Spence, W. G. Downs, and T. H. Aitken.** 1961. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **10**:574-578.
- Anderson, J. F., T. G. Andreadis, A. J. Main, F. J. Ferrandino, and C. R. Vossbrinck.** 2006. West Nile virus from female and male mosquitoes (Diptera: Culicidae) in subterranean, ground, and canopy habitats in Connecticut. *J. Med. Entomol.* **43**:1010-1019.
- Attoui, H., J. F. Mohd, M. Belhouchet, N. Aldrovandi, S. Tao, B. Chen, G. Liang, R. B. Tesh, M. P. de, und L. de, X.** 2005. Yunnan orbivirus, a new orbivirus species isolated from *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes in China. *J. Gen. Virol.* **86**:3409-3417.
- Austgen, L. E., R. A. Bowen, M. L. Bunning, B. S. Davis, C. J. Mitchell, and G. J. Chang.** 2004. Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:82-86.
- Bae, H. G., A. Nitsche, A. Teichmann, S. S. Biel, and M. Niedrig.** 2003. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *J. Virol. Methods* **110**:185-191.
- Bell, D. M.** 2004. Public health interventions and SARS spread, 2003. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1900-1906.
- Biel, S. S. G. H. R.** 1999. Electron microscopy of viruses, p. 111-147. *In* Alan J. Cann (ed.), *Virus Cell Culture*. Oxford University, Oxford.
- BG Chemie.** Classification of Biological Agents: VIRUSES. 1998, p. B004e. Biotechnologie (B-Reihe). BG Chemie, Heidelberg.
- Boesch, C.** 1994. Chimpanzees - red colobus: a predator-prey system. *Animal Behaviour* **47**:1135-1148.
- Boesch, C. and H. Boesch-Achermann.** 2000. The Chimpanzees of the Tai Forest: Behavioural Ecology and Evolution. Oxford University Press, Oxford/New York.
- Bourhy, H., J. A. Cowley, F. Larrous, E. C. Holmes, and P. J. Walker.** 2005. Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene. *J. Gen. Virol.* **86**:2849-2858.
- Brown, S. E., B. M. Gorman, R. B. Tesh, and D. L. Knudson.** 1993. Coltiviruses isolated from mosquitoes collected in Indonesia. *Virology* **196**:363-367.
- Burke, D. S. and T. P. Monath.** 2001. Flaviviruses, p. 1043-1125. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Field's Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Cabre, O., J. P. Durand, A. Prange, J. Gomez, L. Maurizi, H. Tolou, and B. Davoust.** 2005. [West Nile virus infection: serological investigation among horses in France and in Africa]. *Med. Trop. (Mars.)* **65**:439-443.

- Calisher, C. H., N. Karabatsos, J. M. Dalrymple, R. E. Shope, J. S. Porterfield, E. G. Westaway, and W. E. Brandt.** 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* **70** (Pt 1):37-43.
- Chen, B. and S. Tao.** 1996. Arbovirus survey in China in recent ten years. *Chin Med J* **109**:13-15.
- Cook, S., S. N. Bennett, E. C. Holmes, C. R. De, G. Moureau, and L. de, X.** 2006. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J. Gen. Virol.* **87**:735-748.
- Cordellier, R.** 1978. Les vecteurs potentiels sauvages dans l'épidémiologie de la fièvre jaune en Afrique de l'Ouest. Travaux et Documents de l'O.R.S.T.O.M., Bib: Bondy.
- Cordellier, R. and P. Akoliba.** 1981. Les moustiques de la forêt sempéverente du sud-ouest ivoirien. *Ent. méd. et Parasitol. O. R. S. T. O. M.* **19**:297-301.
- Cordellier, R., A. Chippaux, N. Monteny, G. Hème, B. Courtois, M. Germain, and J. P. Digoutte.** 1982. Isolements du virus Orungo à partir de femelles et de mâles d'*Aedes* selvatiques capturés en Côte d'Ivoire. *Ent. méd. et Parasitol. O. R. S. T. O. M.* **20**:265-267.
- Cordellier, R., B. Bouchité, J.-C. Roche, N. Monteny, B. Diaco, and P. Akoliba.** 1983. Circulation selvatique du virus Dengue 2 en 1980, dans les savanes sub-soudaniennes de Côte d'Ivoire. *Ent. méd. et Parasitol. O. R. S. T. O. M.* **11**:165-179.
- Cornet, M., Y. Robin, G. Hème, and M. Valade.** 1978. [Isolation in east Senegal of a yellow fever virus strain from a pool of *Aedes* belonging to the subgenus *Diceromyia*]. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **287**:1449-1451.
- Cornet, M., Y. Robin, G. Hème, C. Adam, and u.a.** 1979. Isolements d'arbovirus au Sénégal oriental à partir de moustiques (1972-1977) et notes sur l'épidémiologie des virus transmis par les *Aedes*, en particulier du virus amaril. *Ent. méd. et Parasitol. O. R. S. T. O. M.* **17**:149-163.
- Cornet, M., Germain, M., Herve, J. P., and Mouchet, J.** Virus-mosquitoes relationships. *Proceedings International Symposium New Aspects in Ecology of Arboviruses.* 244-255. 1980.
- Courturier, R., M. Donskoff, D. Duviard, and C. Lecordier.** 1984. Influence de la penetration humaine sur les peuplements entomologiques en forêt de Tai (Côte d'Ivoire). *Annales de l'Université d'Abidjan, série E (Ecologie)* **17**:153-182.
- Coz, J., M. Valade, M. Cornet, M. D. Lemoine, and A. Lorand.** 1977. Utilisation du moustique pour la multiplication des arbovirus. *Cah. O. R. S. T. O. M., sér. Ent. méd. et Parasitol.* **XV**:209-212.
- Crabtree, M. B., R. C. Sang, V. Stollar, L. M. Dunster, and B. R. Miller.** 2003. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Arch. Virol.* **148**:1095-1118.
- Diallo, M., J. Thonnon, M. Traore-Lamizana, and D. Fontenille.** 1999. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **60**:281-286.
- Diallo, M., P. Nabeth, K. Ba, A. A. Sall, Y. Ba, M. Mondo, L. Girault, M. O. Abdalahi, and C. Mathiot.** 2005. Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal. *Med. Vet. Entomol.* **19**:119-126.
- Diaz, L. A., V. Re, W. R. Almiron, A. Farias, A. Vazquez, M. P. Sanchez-Seco, J. Aguilar, L. Spinsanti, B. Konigheim, A. Visintin, J. Garcia, M. A. Morales, A. Tenorio, and M. Contigiani.** 2006. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1752-1754.

- Diniz, J. A., M. R. Nunes, A. P. Travassos da Rosa, A. C. Cruz, S. W. de, D. B. Medeiros, J. O. Chiang, and P. F. Vasconcelos. 2006. Characterization of two new rhabdoviruses isolated from midges (*Culicoides* spp) in the Brazilian Amazon: proposed members of a new genus, *Bracorhabdovirus*. *Arch. Virol.* **151**:2519-2527.
- Doucet, J. 1960a. [Forest mosquitoes of the Republic of the Ivory Coast. II. Preliminary report on the vertical distribution of culicid fauna in the Banco forest (Abidjan)]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* **53**:814-819.
- Doucet, J., J. P. Dam, and G. Binson. 1960b. [Culicidae of the Ivory Coast.]. *Ann. Parasitol. Hum. Comp* **35**:391-408.
- Editorial. 2003. We have been warned. *Nature* **424**:113.
- Edwards, F. W. 1941. Mosquitoes of the Ethiopian Region. III- Culicine adults and pupae. British Museum (Nat. Hist.), London.
- Elliot, R. M., M. Bouloy, C. H. Calisher, R. Goldbach, J. T. Moyer, S. T. Nichol, R. Pettersson, A. Plyusnin, and C. S. Schmaljohn. 2000. Family *Bunyaviridae*, p. 699-621. In M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, and Bishop D.H.L. (eds.), *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego.
- Ergonul, O. 2006. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect. Dis.* **6**:203-214.
- Feres, V. C., C. M. Martelli, M. D. Turchi, J. B. Junior, R. M. Nogueira, B. A. Rocha, L. F. Silva, M. M. de Jesus Silva, and D. D. de Paula Cardoso. 2006. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. *J. Clin. Virol.* **37**:179-183.
- Formenty, P., C. Boesch, M. Wyers, C. Steiner, F. Donati, F. Dind, F. Walker, and G. B. Le. 1999. Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Cote d'Ivoire. *J. Infect. Dis.* **179** Suppl 1:S120-S126.
- Geier, M. 2000. Olfaktorische Wirtsfindung bei Stechmücken. *Journal Flug- und Reisemedizin* **7**:16-20.
- Gentile, M. and H. R. Gelderblom. 2005. Rapid viral diagnosis: role of electron microscopy. *New Microbiol.* **28**:1-12.
- Germain, M., J.-P. Hervé, and B. Geoffroy. 1977. Variations du taux de survie des femelles d'*Aedes africanus* (Theo.) dans une gallerie forestière du sud de l'Empire Centrafrican. *Ent. méd. et Parasitol. O. R. S. T. O. M.* **15**:291-299.
- Germain, M., M. Cornet, J. Mouchet, J. P. Herve, V. Robert, J. L. Camicas, R. Cordellier, J. P. Herve, J. P. Digoutte, T. P. Monath, J. J. Salaun, V. Deubel, Y. Robin, J. Coz, R. Taufflieb, J. F. Saluzzo, and J. P. Gonzalez. 1981. [Sylvatic yellow fever in Africa recent advances and present approach (author's transl)]. *Med. Trop. (Mars.)* **41**:31-43.
- Germain, M., M. Cornet, J. Mouchet, T. P. Monath, and u.a. 1982. Recent advances in research regarding sylvatic yellow fever in west and central africa. *Bulletin de l'institut Pasteur* **80**:315-330.
- Gillies M.T. and De Meillon B. 1968. The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). The South African Institute for Medical Research, Johannesburg, South Africa.
- Gillies M.T. and Coetzee M. 1987. A Supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). The South African Institute for Medical Research, Johannesburg, South Africa.

- Guan, Y., B. J. Zheng, Y. Q. He, X. L. Liu, Z. X. Zhuang, C. L. Cheung, S. W. Luo, P. H. Li, L. J. Zhang, Y. J. Guan, K. M. Butt, K. L. Wong, K. W. Chan, W. Lim, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, J. S. Peiris, and L. L. Poon. 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* **302**:276-278.
- Gubler, D. J. 1997. Human behaviour and cultural context in disease control. *Trop. Med. Int. Health* **2**:A1-A2.
- Guzman, M. G., G. Kouri, L. Valdes, J. Bravo, S. Vazquez, and S. B. Halstead. 2002. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev. Panam. Salud Publica* **11**:223-227.
- Hamre, D., D. A. Kindig, and J. Mann. 1967. Growth and intracellular development of a new respiratory virus. *J. Virol.* **1**:810-816.
- Harbach, R. E. 1988. The mosquitoes subgenus *Culex* in Southwestern Asia and Egypt (Diptera: Culicidae). *Contribut Am Entomol Inst* **24**:240.
- Hayat, M. A. 2000. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. Macmillan Press Houndmills, Basingstoke London .
- Hayes, E. B. and D. J. Gubler. 2006. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu. Rev. Med.* **57**:181-194.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**:986-994.
- Hervé, J.-P., M. Germain, and B. Geoffroy. 1977. Biologie comparée d'*Aedes (Stegomyia) opok* Corbet et Van Someren et A. (*S.*) *africanus* (Theo.) dans une galerie du sud de l'Empire centrafricain. *Ent. méd. et Parasitol. O. R. S. T. O. M.* **15**:271-282.
- Hoek van der, L. K. Pirc, M.F. Jebbink, W. Vermeulen-Oost, R.J. Berkhout, K.C. Wolthers, P.M. Wertheim-van Dillen, J. Kaandorp, J. Spaargaren, and B. Berkhout. 2004. Identification of a new human Coronavirus. *Nat. Med.* **10**:368-73.
- Hoogstraal, H. 1979. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J. Med. Entomol.* **15**:307-417.
- Howe, D. K., M. H. Vodkin, R. J. Novak, C. J. Mitchell, and G. L. McLaughlin. 1992. Detection of St. Louis encephalitis virus in mosquitoes by use of the polymerase chain reaction. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **8**:333-335.
- Hoshino, K., H. Isawa , Y. Tsuda, K. Yano, T. Sasaki, M. Yuda, T. Takasaki, M. Kobayasi, and K. Sawabe. 2007. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virol.* **15**:405-414.
- Iwanowicz, L. R. and A. E. Goodwin. 2002. A new bacilliform fathead minnow rhabdovirus that produces syncytia in tissue culture. *Arch. Virol.* **147**:899-915.
- Joshi, V., D. T. Mourya, and R. C. Sharma. 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**:158-161.
- Jupp P. 1996. Mosquitoes of southern Africa. Ekoglide Publishers, Hartebeespoort, South Africa.
- Jupp, P. G., A. A. Grobbelaar, P. A. Leman, A. Kemp, R. F. Dunton, T. R. Burkot, T. G. Ksiazek, and R. Swanepoel. 2000. Experimental detection of Rift Valley fever virus by reverse transcription-polymerase chain reaction assay in large samples of mosquitoes. *J. Med. Entomol.* **37**:467-471.

- Kallio-Kokko, H., N. Uzategui, O. Vapalahti, and A. Vaheri.** 2005. Viral zoonoses in Europe. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:1051-1077.
- Karabatsos, N.** International catalogue of arboviruses. 3rd ed. 1985. San Antonio, Texas, American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- Kharitonova, N. N. and J. A. Leonov.** 1985. Omsk hemorrhagic fever. Amerind Publishing, New Delhi.
- Klee, S. R., M. Ozel, B. Appel, C. Boesch, H. Ellerbrok, D. Jacob, G. Holland, F. H. Leendertz, G. Pauli, R. Grunow, and H. Nattermann.** 2006. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J. Bacteriol.* **188**:5333-5344.
- Kramer, L. D., T. M. Wolfe, E. N. Green, R. E. Chiles, H. Fallah, Y. Fang, and W. K. Reisen.** 2002. Detection of encephalitis viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and avian tissues. *J. Med. Entomol.* **39**:312-323.
- Kramer, L.D., G.D. Ebel.** 2003. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv. Virus. Res.* **60**:187-232.
- Kraus, H., A. Weber, M. Appel, B. Enders, A. von Graevenitz, H. Isenberg, H. G. Schiefer, W. Slenczka, and H. Zahner.** 2007. Zoonosen. Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- Krockel, U., A. Rose, A. E. Eiras, and M. Geier.** 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **22**:229-238.
- Kuniholm, M. H., N. D. Wolfe, C. Y. Huang, E. Mpoudi-Ngole, U. Tamoufe, M. LeBreton, D. S. Burke, and D. J. Gubler.** 2006. Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**:1078-1083.
- Kuno, G., G. J. Chang, K. R. Tsuchiya, N. Karabatsos, and C. B. Cropp.** 1998. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* **72**:73-83.
- Kuzmin, I. V., G. J. Hughes, and C. E. Rupprecht.** 2006. Phylogenetic relationships of seven previously unclassified viruses within the family *Rhabdoviridae* using partial nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.* **87**:2323-2331.
- Lashley, F. R.** 2006. Transmission and epidemiology of HIV/AIDS: a global view. *Nurs. Clin. North Am* **41**:339-54, v.
- Laveissière, C. and J.-P. Kiéno.** 1979. Effets de l'accroissement des activités humaines sur la forêt du sud-ouest de la Côte d'Ivoire. Enquête sur les Glossines de la forêt de Tai. Centre Muraz et Mission O. R. S. T. O. M. auprès de l'OCCGE, Bobo-Dioulasso.1-9.
- Lawrence, J. and D. R. Hill.** 2005. Largest ever Marburg haemorrhagic fever outbreak, Angola. *Euro. Surveill* **10** :E050407.
- Learned, L. A., M. G. Reynolds, D. W. Wassa, Y. Li, V. A. Olson, K. Kareem, L. L. Stempora, Z. H. Braden, R. Kline, A. Likos, F. Libama, H. Moudzeo, J. D. Bolanda, P. Tarangonia, P. Boumandoki, P. Formenty, J. M. Harvey, and I. K. Damon.** 2005. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**:428-434.
- Leendertz, F. H., C. Boesch, S. Junglen, G. Pauli, and H. Ellerbrok.** 2003. Characterization of a new simian T-lymphocyte virus type 1 (STLV-1) in a wild living chimpanzee (*Pan troglodytes verus*) from Ivory Coast: evidence of a new STLV-1 group? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **19**:255-258.

- Leendertz, F. H., H. Ellerbrok, C. Boesch, E. Couacy-Hymann, K. Matz-Rensing, R. Hakenbeck, C. Bergmann, P. Abaza, S. Junglen, Y. Moebius, L. Vigilant, P. Formenty, and G. Pauli. 2004a. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature* **430**:451-452.
- Leendertz, F. H., C. Boesch, H. Ellerbrok, W. Rietschel, E. Couacy-Hymann, and G. Pauli. 2004b. Non-invasive testing reveals a high prevalence of simian T-lymphotropic virus type 1 antibodies in wild adult chimpanzees of the Tai National Park, Cote d'Ivoire. *J. Gen. Virol.* **85**:3305-3312.
- Leendertz, F. H., S. Yumlu, G. Pauli, C. Boesch, E. Couacy-Hymann, L. Vigilant, S. Junglen, S. Schenk, and H. Ellerbrok. 2006. A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from West and Central Africa. *PLoS. Pathog.* **2**:e8.
- Leroy, E. M., P. Rouquet, P. Formenty, S. Souquiere, A. Kilbourne, J. M. Froment, M. Bermejo, S. Smit, W. Karesh, R. Swanepoel, S. R. Zaki, and P. E. Rollin. 2004. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science*. **303**:387-390.
- Li, W., Z. Shi, M. Yu, W. Ren, C. Smith, J. H. Epstein, H. Wang, G. Crameri, Z. Hu, H. Zhang, J. Zhang, J. McEachern, H. Field, P. Daszak, B. T. Eaton, S. Zhang, and L. F. Wang. 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**:676-679.
- Liting, S., B. Chen, and Z. Chou. 1995. Isolation and identification of new members of coltivirus from mosquitoes collected in China. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **9**:7-10.
- Liu, S., J. Chen, J. Chen, X. Kong, Y. Shao, Z. Han, L. Feng, X. Cai, S. Gu, and M. Liu. 2005. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). *J. Gen. Virol.* **86**:719-725.
- Lu, Y. and P. C. Loh. 1992. Some biological properties of a rhabdovirus isolated from penaeid shrimps. *Arch. Virol.* **127**:339-343.
- Lundstrom, J. O. 1999. Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *J. Vector. Ecol.* **24**:1-39.
- Mackenzie, J. S., D. J. Gubler, and L. R. Petersen. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* **10**:98-109.
- Mackenzie, J. S. 2005. Emerging zoonotic encephalitis viruses: lessons from Southeast Asia and Oceania. *J. Neurovirol.* **11**:434-440.
- Macnaughton, M. R., B. J. Thomas, H. A. Davies, and S. Patterson. 1980. Infectivity of human coronavirus strain 229E. *J. Clin. Microbiol.* **12**:462-468.
- Mandalakas, A. M., C. Kippes, J. Sedransk, J. R. Kile, A. Garg, J. McLeod, R. L. Berry, and A. A. Marfin. 2005. West Nile virus epidemic, northeast Ohio, 2002. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:1774-1777.
- Martin, C. 1989. *Die Regenwälder Westafrikas: Ökologie, Bedrohung und Schutz*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Martina, B. E., B. L. Haagmans, T. Kuiken, R. A. Fouchier, G. F. Rimmelzwaan, A. G. Van, J. S. Peiris, W. Lim, and A. D. Osterhaus. 2003. Virology: SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature* **425**:915.
- Martins-Neto, R. G. 2003. The fossil tabanids (Diptera Tabanidae): when they began to appreciate warm blood and when they began transmit diseases? *Mem. Inst Oswaldo Cruz* **98 Suppl 1**:29-34.
- Matthys, B., E. K. N'Goran, M. Kone, B. G. Koudou, P. Vounatsou, G. Cisse, A. B. Tschannen, M. Tanner, and J. Utzinger. 2006. Urban agricultural land use and characterization of mosquito larval habitats in a medium-sized town of Cote d'Ivoire. *J. Vector. Ecol.* **31**:319-333.

- Mendez, F., M. Barreto, J. F. Arias, G. Rengifo, J. Munoz, M. E. Burbano, and B. Parra.** 2006. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**:678-683.
- Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen.** 2003. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Monath, T. P.** 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infect. Dis.* **1**:11-20.
- Monto, A. S. and L. M. Rhodes.** 1977. Detection of coronavirus infection of man by immunofluorescence. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **155**:143-148.
- Morales, M.A., M. Barrandeguy, C. Fabbri, J.B. Garcia, A. Vissani, K. Trono, G. Gutierrez, S. Pigretti, H. Menchaca, N. Garrido, N. Taylor, F. Fernandez, S. Levis, D. Enria.** 2006. West Nile virus isolations from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1559-61.
- Morse, S. S. and A. Schluederberg.** 1990. From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, the Fogarty International Center of the National Institutes of Health, and the Rockefeller University. Emerging viruses: the evolution of viruses and viral diseases. *J. Infect. Dis.* **162**:1-7.
- Murgue, B., H. Zeller, and V. Deubel.** 2002. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **267**:195-221.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., and Mayo M.A.** Virus taxonomy: classification and nomenclature of virus. Summers M.D. 415-421. 1995. New York, N. Y., Springer Verlag.
- Mutebi, J. P. and A. D. Barrett.** 2002. The epidemiology of yellow fever in Africa. *Microbes. Infect.* **4**:1459-1468.
- Nichol, S. T.** 2001. Bunyaviruses, p. 1603-1633. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, A. R. Hunt, and D. E. Griffin (eds.), *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Nisbet, D. J., K. J. Lee, A. F. van den Hurk, C. A. Johansen, G. Kuno, G. J. Chang, J. S. Mackenzie, S. A. Ritchie, and R. A. Hall.** 2005. Identification of new flaviviruses in the Kokobera virus complex. *J. Gen. Virol.* **86**:121-124.
- Nishiyama, Y., Y. Ito, K. Shimokata, I. Nagata, N. Kurachi, and Y. Sugiura.** 1977. Comparative studies on cytopathic effects induced by vesicular stomatitis virus in two cell types. *Microbiol. Immunol.* **21**:693-702.
- Nunes, M. R., L. C. Martins, S. G. Rodrigues, J. O. Chiang, R. S. Azevedo, A. P. Da Rosa, and P. F. Vasconcelos.** 2005. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:1610-1613.
- Oates, J.** 1985. Action plan for African Primates Conservation: 1986-1990. IUCN, Gland.
- Palese, P.** 2006. Influenza pandemics: past and future. *Retrovirology*. **3 Suppl 1**:S55.
- Pinheiro, F. P., M. Pinheiro, Bensabath G., O. R. Causey, and R. E. Shope.** 1962. Epidemia de virus Oropouche em Belém. *Revista do serviço Especial de Saúde Pública.* **12**:15-23.
- Pinheiro, F. P., A. P. A. Travassos da Rosa, and P. F. C. Vasconcelos.** 2004. Oropouche fever., p. 2418-2423. *In* R. D. Feigin (ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Pisano, M. R., J. Nicoli, and H. Tolou.** 1997. Homogeneity of yellow fever virus strains isolated during an epidemic and a post-epidemic period in West Africa. *Virus Genes* **14**:225-234.

- Pybus, O. G., A. Rambaut, E. C. Holmes, and P. H. Harvey .** 2002. New inferences from tree shape: numbers of missing taxa and population growth rates. *Syst. Biol.* **51**:881-888.
- Pyrç van der, H. L., K., M. F. Jebbink, W. Vermeulen-Oost, R. J. Berkhout, K. C. Wolthers, P. M. Wertheim-van Dillen, J. Kaandorp, J. Spaargaren, and B. Berkhout.** 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**:368-373.
- Reed, L. J. and H. Muench.** 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *The American Journal of Hygiene* **27**:493-497.
- Refaie, F. M., A. Y. Esmat, A. F. Mohamed, and W. A. Mohamed.** 2004. The effect of chemical inactivation of bovine viral diarrhea virus with beta-propiolactone and binary ethyleneimine on plasma proteins and coagulation factors. *Egypt. J. Immunol.* **11**:9-20.
- Reid, H. W.** 1988. Louping Ill, p. 117-135. *In* T. P. Monath (ed.), *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. CRC Press, Boca Raton.
- Regenmortel van, M. H. V., C. M. Fauquet, Bishop D.H.L., E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, Mayo M.A., D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner.** 2000. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Robin, Y., P. Bres, J. J. Lartigue, R. Gidel, M. Lefevre, B. Athawet, and G. Hery.** 1968. [Arboviruses in Ivory Coast. Serologic survey in the human population]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* **61**:833-845.
- Rodhain, F., J. P. Gonzalez, E. Mercier, B. Helynck, B. Larouze, and C. Hannoun.** 1989. Arbovirus infections and viral haemorrhagic fevers in Uganda: a serological survey in Karamoja district, 1984. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**:851-854.
- Rosen, L. and D. Gubler.** 1974. The use of mosquito to detect and propagate Dengue viruses. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **23**:1153-1160.
- Rosen, L., D. A. Shroyer, and J. C. Lien.** 1980. Transovarial transmission of Japanese encephalitis virus by *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**:711-712.
- Rosen, L.** 1981. [Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes (author's transl)]. *Med. Trop. (Mars.)* **41**:23-29.
- Russell, R. C., C. E. Webb, and N. Davies.** 2005. *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes polynesiensis* Marks (Diptera: Culicidae) in Moorea, French Polynesia: a study of adult population structures and pathogen (*Wuchereria bancrofti* and *Dirofilaria immitis*) infection rates to indicate regional and seasonal epidemiological risk for dengue and filariasis. *J. Med. Entomol.* **42**:1045-1056.
- Saeed, M. F., H. Wang, M. Nunes, P. F. Vasconcelos, S. C. Weaver, R. E. Shope, D. M. Watts, R. B. Tesh, and A. D. Barrett.** 2000. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. *J. Gen. Virol.* **81**:743-748.
- Sang, R. C., A. Gichogo, J. Gachoya, M. D. Dunster, V. Ofula, A. R. Hunt, M. B. Crabtree, B. R. Miller, and L. M. Dunster.** 2003. Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch. Virol.* **148**:1085-1093.
- Sang, R., C. Onyango, J. Gachoya, E. Mabinda, S. Konongoi, V. Ofula, L. Dunster, F. Okoth, R. Coldren, R. Tesh, A. Travassos da Rosa, S. Finkbeiner, D. Wang, M. Crabtree, B. Miller.** 2006. Tickborne arbovirus surveillance in Market Livestock, Nairobi, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1074-1080.

- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:5463-5467.
- Schopen, S., M. Labuda, and B. Beaty.** 1991. Vertical and venereal transmission of California group viruses by *Aedes triseriatus* and *Culiseta inornata* mosquitoes. *Acta Virol.* **35**:373-382.
- Simpson, D. I., C. E. Smith, T. F. Marshall, G. S. Platt, H. J. Way, E. T. Bowen, W. F. Bright, J. Day, D. A. McMahon, M. N. Hill, P. J. Bendell, and O. H. Heathcote.** 1976. Arbovirus infections in Sarawak: the role of the domestic pig. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **70**:66-72.
- Stang, A., K. Korn, O. Wildner, and K. Uberla.** 2005. Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. *J. Clin. Microbiol.* **43**:716-720.
- Stephensen, C. B., D. B. Casebolt, and N. N. Gangopadhyay.** 1999. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.* **60**:181-189.
- Stollar, V. and V. L. Thomas.** 1975. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology* **64**:367-377.
- Tang, X. C., J. X. Zhang, S. Y. Zhang, P. Wang, X. H. Fan, L. F. Li, G. Li, B. Q. Dong, W. Liu, C. L. Cheung, K. M. Xu, W. J. Song, D. Vijaykrishna, L. L. Poon, J. S. Peiris, G. J. Smith, H. Chen, and Y. Guan.** 2006. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J. Virol.* **80**:7481-7490.
- Tesh, R. B.** 1980. Experimental studies on the transovarial transmission of Kunjin and San Angelo viruses in mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**:657-666.
- Tesh, R. B. and G. B. Modi.** 1983. Growth and transovarial transmission of Chandipura virus (Rhabdoviridae: Vesiculovirus) in phlebotomus papatasi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**:621-623.
- Tesh, R. B.** 1994. The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **740**:129-137.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tordo, N., A. Benmansour, C. Calisher, and 7 other authors.** 2004. Rhabdoviridae, p. 623-644. In C. M. Fauquet, Mayo M.A., J. Maniloff, Desselberger U., and Ball L.A. (eds.), *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press, London.
- Traore-Lamizana, M., D. Fontenille, M. Diallo, Y. Ba, H. G. Zeller, M. Mondo, F. Adam, J. Thonon, and A. Maiga.** 2001. Arbovirus surveillance from 1990 to 1995 in the Barkedji area (Ferlo) of Senegal, a possible natural focus of Rift Valley fever virus. *J. Med. Entomol* **38**:480-492.
- Turell, M. J., M. L. O'Guinn, J. W. Jones, M. R. Sardelis, D. J. Dohm, D. M. Watts, R. Fernandez, R. A. Travassos da, H. Guzman, R. Tesh, C. A. Rossi, V. Ludwig, J. A. Mangiafico, J. Kondig, L. P. Wasieloski, Jr., J. Pecor, M. Zyzak, G. Schoeler, C. N. Mores, C. Calampa, J. S. Lee, and T. A. Klein.** 2005. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *J. Med. Entomol.* **42**:891-898.
- Vasconcelos, P. F., Z. G. Costa, E. S. Travassos Da Rosa, E. Luna, S. G. Rodrigues, V. L. Barros, J. P. Dias, H. A. Monteiro, O. F. Oliva, H. B. Vasconcelos, R. C. Oliveira, M. R. Sousa, S. J. Barbosa Da, A. C. Cruz, E. C. Martins, and J. F. Travassos Da Rosa.** 2001. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. *J. Med. Virol.* **65**:598-604.

- Vasconcelos, P. F., J. E. Bryant, T. P. da Rosa, R. B. Tesh, S. G. Rodrigues, and A. D. Barrett.** 2004. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1578-1584.
- Vesjenjak-Hirjan, J., V. Punda-Polic, and M. Dobe.** 1991. Geographical distribution of arboviruses in Yugoslavia. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **35**:129-140.
- Watts, D. M., I. Phillips, J. D. Callahan, W. Griebenow, K. C. Hyams, and C. G. Hayes.** 1997. Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **56**:148-152.
- Williams, C. R., S. A. Long, R. C. Russell, and S. A. Ritchie.** 2006. Field efficacy of the BG-Sentinel compared with CDC Backpack Aspirators and CO₂-baited EVS traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **22**:296-300.
- Zhou, G. Z., Z. Q. Li, and Q. Y. Zhang.** 2006. Characterization and application of monoclonal antibodies against turbot (*Scophthalmus maximus*) Rhabdovirus. *Viral Immunol.* **19**:637-645.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. G. Pauli, für die Möglichkeit die Arbeit am Robert Koch-Institut durchzuführen, für die vielen anregenden Diskussionen und für die stete und engagierte Unterstützung und Betreuung. Mein weiterer Dank geht an Dr. H. Ellerbrok, der mir bei der Planung der Versuche und Interpretation der Laborergebnisse zur Seite gestanden hat. Prof. Dr. R. Lauster möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit danken.

Bei Christophe Boesch möchte ich für den Aufenthalt am Nordcamp zur Probensammlung im Taï Nationalpark bedanken. Germain Gagné danke ich herzlich für seine große Unterstützung bei der Probensammlung. Weiterhin möchte ich an der Elfenbeinküste dem Direktor des Taï Nationalparks, dem *Projet Autonome pour la Conservation du Parc National de Taï* (PACPNT), dem *Centre de Recherche Ecologique* (CRE), der Forstbehörde und dem Forschungsminister danken, dass sie mir gestattet haben dieses Projekt durchzuführen.

Dem Museum für Naturkunde in Berlin danke ich für die Bereitstellung der Moskitoexemplare zum Erlernen der Bestimmungsmerkmale.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. F. H. Leendertz für die wertvollen Anregungen und für die Hilfe bei der Planung und Durchführung der Arbeit bedanken. Das Wissen über Virusanzucht und -kultivierung habe ich Frau Sim-Brandenburg zu verdanken, die mir stets mit Rat und Tat behilflich war. Dr. A. Kurth danke ich für die Untersuchung meiner Proben am Elektronenmikroskop und für die photographische Dokumentation. Dr. A. Nitsche danke ich für das Design der Sonden und Primer für die *Real-Time* PCR. Bei dem Sequenzierteam, Frau Buwitt und Frau Tesch, möchte ich mich für die Sequenzierung der Virusisolate bedanken. Ein großes Dankeschön geht an alle Herberts, die eine tolle Arbeitsatmosphäre verbreiten und von denen man sowohl während der Arbeit als auch privat immer aufgeheitert wird. Sascha Engel danke ich für die Rettung meines Ergebnisteils, der zusammen mit meiner Festplatte abgestürzt ist.

Mein Dank für die finanzielle Unterstützung während der drei Jahre der Arbeit geht an die Nachwuchsförderungsgesetz (NaföG) und an Aventis Ilab, die die Kosten für den Flug an die Elfenbeinküste übernommen haben.

Meinem Freund Mathias Becker möchte ich für jegliche Unterstützung während der Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben und immer da sind, um mich in allen Lebenslagen zu unterstützen.

8 Selbständigkeitserklärung

Ich bestätige, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind. Veröffentlichungen von Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir nicht vorgenommen worden. Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionsöffnungsverfahren beantragt habe.

Berlin, den 30.04.07

Sandra Junglen

9 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Sandra Junglen
Geburtsdatum und -ort	12.05.1979 in Wittlich
Nationalität	deutsch
Eltern	Nikolaus Junglen, Brigitte Junglen, geb. Krieger
E-Mail	junglens@rki.de

Ausbildung

1985-1989	Grundschule Köln-Mülheim
1989-1992	Rhein-Gymnasium in Köln-Mülheim
1992-1998	Cusanus-Gymnasium in Wittlich
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
WS 1998/99 - SS2003	Biologie (Diplom) an der Justus-Liebig-Universität, Gießen; Diplomarbeit „Phylogenetische und funktionale Analyse von STLV-1 Isolaten aus Schimpansen (<i>Pan troglodytes verus</i>) des Taï National Parks, Côte d'Ivoire.“
August 2003	Erhalt des akademischen Grades der Diplom-Biologin
Nov. 2001- Mai 2002	Praktikum im Taï -Nationalpark (Côte d'Ivoire): Verhaltensstudien an freilebenden Schimpansen
Januar 2004 - Juli 2007	Promotion

Fremdsprachenkenntnisse

Englisch (fließend), Französisch (fließend), Deutsch (Muttersprache)

Stipendien

Promotionsstipendium nach dem Nachwuchsförderungsgesetz (NaföG).
Reisestipendium Aventis Ilab.

Veröffentlichungen

- Leendertz, F. H., Boesch, C., **Junglen, S.**, Pauli, G. & Ellerbrok, H. (2003). Characterization of a new simian T-lymphocyte virus type 1 (STLV-1) in a wild living chimpanzee (*Pan troglodytes verus*) from Ivory Coast: evidence of a new STLV-1 group? *AIDS Res Hum Retroviruses* 19: 255-258.
- Leendertz, F. H., Ellerbrok, H., Boesch, C., Couacy-Hymann, E., Matz-Rensing, K., Hakenbeck, R., Bergmann, C., Abaza, P., **Junglen, S.**, Moebius, Y., Vigilant, L., Formenty, P. & Pauli, G. (2004). Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature* 430, 451-452.
- Leendertz, F.H., **Junglen, S.**, Boesch, C., Formenty, P., Couacy Hymann, E., Courgnaud, V., Pauli, G., & Ellerbrok, H. (2004). High variety of different STLV-1 strains in chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) of the Taï National Park, Côte d'Ivoire. *J of Virol* 78: 4352-4356.
- Leendertz, F. H., Yumlu, S., Pauli, G., Boesch, C., Couacy-Hymann, E., Vigilant, L., **Junglen, S.**, Schenk, S. & Ellerbrok, H. (2006). A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from West and Central Africa. *PLoS Pathog* 2, e8.
- Leendertz, F. H., Pauli, G., Matz-Rensing, K., Boardman, W., Nunn, C., Ellerbrok, H., Jensen, S.A., **Junglen, S.**, Boesch, C. (2006). Pathogens as drivers of population declines. The importance of systematic monitoring in great apes and other threatened mammals. *Biol Cons* 131: 325-337.