



Etablierung eines Lateral- Flow- Assays zur Detektion des Rifttalfiebervirus

Masterarbeit zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Vorgelegt von: Lena Schnittke

Durchgeführt am: Friedrich- Loeffler- Institut

Betreuer der Hochschule: Prof. Dr. Christine Wittmann

Betreuer im Unternehmen: Dr. Martin Eiden

Bearbeitungszeitraum: 08.12.2022- 08.06.2023

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2022-0295-0

Neubrandenburg, 22.05.2023

Abstract

Rift Valley fever virus is an RNA virus transmitted by mosquitoes that mainly affects livestock such as cattle, sheep and goats. In these animals, it can cause severe symptoms with a high mortality rate. Since the disease can also be transmitted to humans through infected tissue or body fluids, it is considered as zoonosis. In this work, a lateral flow assay (LFA) was developed and established for the detection of Rift Valley fever virus. The assay bases on antigen detection either the nucleocapsid protein (NP) or the glycoprotein (GN) of the virus. Monoclonal antibodies directed against both proteins were used for this purpose and successfully pre- tested for the corresponding antigen by a sandwich ELISA. In the LFA, the primary antibody was fixed on the membrane and served as a capture antibody, while the secondary antibody was coupled to colloidal gold particles which cause the color signal. The manufacturing of the test strips including sample, conjugate and absorption pads as well as test and control lines was successful. The corresponding recombinant antigens, as well as the RVFV vaccine strains MP12 and Clone 13 could be correctly detected. However, due to the handmade production process a high variance in sensitivity and specificity was observed. In summary the obtained results were highly promising and a manufacturing process should be optimized in cooperation with a commercial partner to enable a ready- to- use application in the field.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	2
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
2 Stand der Wissenschaft und Technik	8
2.1 Verschiedene Nachweismethoden für das RVFV.....	8
2.2 Real- Time PCR	10
2.3 Sandwich ELISA	10
2.4 Lateral- Flow- Assay.....	11
3 Material und Methoden	13
3.1 Verwendete Materialien.....	13
3.1.1 Geräte und Chemikalien.....	13
3.1.2 Reagenzien und Lösungen für den Sandwich ELISA.....	15
3.1.3 Reagenzien und Lösungen für den LFA	15
3.2 Dialyse der Antikörper und Konzentrationsbestimmung.....	17
3.3 Peroxidase- Kopplung.....	18
3.4 Sandwich- ELISA	19
3.5 Herstellung des Goldkonjugates	21
3.6 Durchführung des LFA	21
3.7 Virusanzucht und Aufkonzentrierung.....	23
3.8 RNA- Extraktion und PCR	27
4 Ergebnisse	33

4.1 Sandwich ELISA	33
4.2 Lateral- Flow- Assay.....	38
5 Diskussion	46
6 Zusammenfassung.....	51
7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	52
8 Literaturverzeichnis	54
Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit	58

Abkürzungsverzeichnis

LFA	Lateral- Flow- Assay
FLI	Friedrich- Loeffler- Institut
IFA	Immunfluoreszenz- Assay
RT- PCR	reverse transcriptase PCR
BSA	bovines Serumalbumin
ABTS	2,2 -Azino- di (3- ethylbenzthiazolin- 6- sulfonsäure)
SDS	Natriumdodecylsulfat
IgG	Immunglobulin- G
IgM	Immunglobulin- M
Gn	Glykoprotein
NP	Nukleokapsidprotein
RVFV	Rift Valley Fever Virus (Rifttafiebervirus)
mAB	monoklonale Antikörper
RT	Raumtemperatur
ZKÜ	Zellkulturüberstand
FKS	fötales Kälberserum
ProA	Staphylococcus- Protein A

1 Einleitung

Das Rifttalfieber (RVF) ist eine zoonotische Krankheit, welche durch das Rifttalfieber- Virus (RVFV) ausgelöst wird. Dieses Virus gehört zur Gattung der *Phleboviren* aus der Familie der *Phenuiviridae* und der Ordnung der *Bunyavirales*. Der Name des Virus leitet sich vom ersten Entdeckungsort, dem Rift Valley in Kenia ab. Dort wurde das Virus erstmals 1930 detektiert. Die Krankheit verbreitete sich in Afrika, sowie in Madagaskar und den Komoren und erreichte 2000 die arabische Halbinsel (Sossah et al., 2019). Betroffen sind dabei hauptsächlich Nutztiere, insbesondere werden Schafe, Rinder und Ziegen infiziert (Wright et al., 2019). Da das Virus durch mehr als 30 Stechmückenarten übertragen werden kann, ist die Gefahr einer größeren globalen Ausbreitung naheliegend. Zu den Hauptüberträgern gehören die Stechmücken der Gattung *Aedes*. Bei dieser Gattung können die Viren vom Muttertier auf die Nachkommen, also transovarial, übertragen werden, da das Virus in den Eiern lebensfähig bleibt (Hartmann, 2017). Seit dem ersten Auftreten kam es zu zahlreichen Ausbrüchen der Krankheit, wobei 1974/ 1975 die ersten Todesfälle beim Menschen registriert wurden (Wright et al., 2019). In den Jahren 1977 und 1978 kam es in Ägypten zu einer Epidemie, in dessen Verlauf circa 200.000 Menschen infiziert wurden, von denen etwa 600 verstarben (Domfe et al., 2022). Dass die Mückenpopulationen nach starken Regenfällen steigen, führte 1997- 1998 in Ostafrika zu einem Ausbruch mit 478 Todesfällen nach circa 89.000 Infektionen beim Menschen (Wright et al., 2019). Doch nicht nur wegen der gesundheitlichen Gefahr für den Menschen stellt das RVFV ein hohes Risiko dar. Für viele Menschen, die in der Landwirtschaft in Afrika tätig sind, stellt die Viehzucht die Haupteinnahmequelle dar. Ausbrüche des RVF führen zu hohen wirtschaftlichen Schäden und können in Nahrungsmittelknappheiten münden (Domfe et al., 2022). Die Insekten, welche als Vektoren für das RVFV fungieren, wurden bereits in Europa und Amerika gefunden, wodurch eine Ausbreitung der Krankheit möglich ist. Die Ausbreitung des West- Nil- Virus von Afrika nach Europa und in die USA, welches ebenfalls durch Mücken übertragen wird, veranschaulicht das Risiko einer solchen Verbreitung.

Das RVFV tritt bei vielen Wildtieren auf, verläuft hier jedoch meistens mild. Für domestizierte Wiederkäuer, insbesondere Jungtiere und Föten, ist das Virus jedoch hochpathogen. In diesen Wirten wird das Virus vermehrt und kann bei einem anschließenden Mückenstich von der Mücke aufgenommen und an ein weiteres Tier weitergegeben werden. Zu den Symptomen gehören Durchfall, Blutungen, Schwäche, Leberschäden, blutiger Nasenausfluss, Erblindung und Enzephalitis. Besonders gefährdet sind ungeborene Tiere, da

die Erkrankung sehr oft zum Tod des Fötus führt. Bei Schafen und Ziegen liegt die Abortrate bei nahezu 100 % (Hartmann, 2017). Generell sind Schafe am anfälligsten für die Krankheit, wobei die Sterblichkeitsrate bei neugeborenen Tieren mit 95- 100 % wesentlich höher liegt als bei erwachsenen Tieren mit 20- 30 %. Bei Ziegen zeigt sich ein ähnliches klinisches Bild wie bei Schafen, jedoch sind die Ausprägungen hier etwas schwächer. Erwachsene Rinder sind am wenigsten anfällig. Die Sterblichkeitsrate liegt hier bei 0- 5 %.

Anders als bei den Nutztieren, erfolgt beim Menschen eine Infektion mit RVF in der Regel über Kontakt mit infektiösem Material, wie Fleisch oder Körperflüssigkeiten. Eine von Mensch- zu Mensch Übertragung konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Eine Infektion beim Menschen verläuft oft mild und selbstlimitierend (Wright et al., 2019). Die Symptome sind in diesen Fällen grippeähnlich und mit Fieber verbunden. Da dies unspezifisch ist, bleiben viele Erkrankungen wahrscheinlich unentdeckt (Petrova et al., 2020). In seltenen Fällen (etwa 1- 2 %) kann es zu einer schweren Erkrankung kommen, welche mit hämorrhagischem Fieber, Hepatitis, Augenkrankheiten, Enzephalitis und einem erhöhten Risiko für Fehlgeburten einhergehen kann (Wright et al., 2019).

Das RVFV besteht aus einem dreiteiligen einzelsträngigen RNA- Genom, welches eine negative Polarität besitzt und kugelförmig umhüllt ist (Bird et al., 2009). Das Virusgenom besteht aus drei verschiedenen Segmenten. Das kleinste Segment, S- Segment genannt, codiert dabei das Nukleoptrotein NP, sowie ein Nicht- Strukturprotein (Nss). Es besitzt eine ambisense Polarität. Das große Segment, L- Segment genannt, codiert die virale RNA- Polymerase, während das mittlere M- Segment die Glykoproteine Gc und Gn und ein Nicht- Strukturprotein (Nsm), codiert. Die Glykoproteine Gn und Gc bilden Dimere, welche sich auf der Hülle des RVFV anlagern und den Eintritt in die Wirtszelle erleichtern (Wright et al., 2019).

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und Optimierung eines Lateral- Flow- Assays zum Nachweis des RVFV über gekoppelte Antikörper, die gegen zwei Antigene des Virus, das Glykoprotein Gn und das Nukleokapsidprotein NP gerichtet sind. Dabei sollen die Proben in Form der gelösten rekombinanten Proteine NP und Gn, als auch inaktive und aktive RVF Virusstämme verwendet werden. Die für den LFA verwendeten monoklonalen Antikörper wurden in früheren Arbeiten bereits hergestellt, indem Mäuse mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen NP und Gn immunisiert und anschließend mittels Hybridomtechnik deren Antikörper produzierende B- Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert wurden. Dabei wurden zahlreiche monoklonale Antikörper gewonnen, die spezifisch gegen NP und Gn gerichtet sind (Jäckel et al., 2014). Bei den eingesetzten RVF- Virusstämmen handelt es sich

um MP12 und Klon 13. Beides sind attenuierte Lebendimpfstoffe gegen das RVFV, die ursprünglich aus humanen Isolaten stammen. Sie stellen eine abgeschwächte Form des Virus dar und werden der Risikogruppe 2 zugeordnet (Dungu et al., 2018). Als Negativkontrolle dienen dabei unter anderem zwei andere Virusstämme, das Batai- und das Bunyamwera-Virus. Beide Virusstämme werden ebenfalls der Ordnung der *Bunyavirales* zugeordnet und wie auch das RVFV von Stechmücken übertragen (Mansfield et al., 2022; Kohl et al., 2004). Die Sichtbarmachung des Nachweises erfolgt über die Kopplung der Antikörper an kolloidale Goldnanopartikel. Das Gold ist aufgrund seiner Biokompatibilität und intensiven Farbe eine häufig verwendete Markierungssonde (Ren et al., 2021). Um die immunchemische Funktionalität der Antigen- Antikörper- Paarungen vorab zu prüfen, soll ein Sandwich-ELISA durchgeführt werden. Die Arbeit stellt eine Zusammenarbeit der Hochschule Neubrandenburg und des Friedrich- Loeffler- Institutes (FLI) dar, wobei die Laborarbeiten am Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger (INNT) durchgeführt wurden. Das Institut stellte alle benötigten Reagenzien und Materialien bereit.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 Verschiedene Nachweismethoden für das RVFV

Da bei einem Ausbruch des RVFV sehr schnell viele Menschen und Tiere betroffen sein können, sind Referenzlabore für einen schnellen Nachweis von großer Wichtigkeit. Diese Labore müssen in der Lage sein, eintreffende Proben schnell und sicher analysieren zu können. Da die Krankheit zu einer hohen Virämie mit hohem Titer führt sind viele verschiedene Proben für die Diagnostik geeignet. Als Untersuchungsmaterial kann sowohl Vollblut, als auch Serum und Gewebe dienen. Für den Nachweis einer Infektion mit dem RVFV können verschiedene Methoden herangezogen werden, um entweder Nukleinsäure, Antigene oder Antikörper nachzuweisen (Bird et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Virusanzucht und Isolierung aus Blutproben auf Zellkulturebene, zum Beispiel mittels Vero- Zellen (Wright et al., 2019). Der serologische Nachweis einer RVFV- Infektion erfolgt über IgM- und IgG- Antikörper, wobei IgM- spezifische Antikörper gegen RVFV auf eine akute Infektion hinweisen. Sie sind etwa 5 Tage nach Infektion bis 45 Tage im Tier nachweisbar. IgG- Antikörper können noch Jahre nach der Infektion nachgewiesen werden (Pepin et al., 2010). Eine andere Methode Antikörper nachzuweisen sind Immunfluoreszenz-Assays (IFA). Im ersten Schritt binden dabei spezifische Antikörper aus der Blutprobe an das

Substrat, in der Regel virusinfizierte Zellen. In einem weiteren Schritt bindet ein fluoreszenzmarkierter Antikörper an die spezifischen RVFV Antikörper aus der Probe, die im Fluoreszenzmikroskop dann sichtbar gemacht werden (Petrova et al., 2020). Der serologische Goldstandard ist der Virusneutralisationstest, bei dem neutralisierende Antikörper aus der Probe die Virusreplikation in Zellkultursystemen spezifisch hemmen. Er ist jedoch mit 5- 7 Tagen Dauer sehr zeitaufwendig und kann nur in speziell ausgestatteten Laboren durchgeführt werden (Fafetine et al., 2007).

Der molekulare Nachweis erfolgt über die reverse transcriptase PCR (RT- PCR), bei welcher die virale RNA nachgewiesen wird. Die RT- PCR ermöglicht einen hohen Probendurchsatz und eine hohe Sensitivität. Jedoch können die viralen Nukleinsäuren nur während der virämischen Phase nachgewiesen werden, die bei Säugetieren etwa 7- 8 Tage andauert (Bird et al., 2009; Pepin et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit des Nachweises ist die histopathologische Methode, bei welcher zum Beispiel die Leber auf spezifische Läsionen hin untersucht wird oder immunhistopathologische Arbeiten, bei denen im Gewebe virale Antigene mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Wright et al., 2019). Welche Methode man für den Nachweis von RVFV verwendet, hängt vom Zeitpunkt der Probenahme, der Ausstattung des Labors, dem Krankheitsverlauf und generell der diagnostischen Fragestellung ab. Ist der Zeitpunkt der Infektion unbekannt, ist es am sinnvollsten eine Kombination aus molekularen und serologischen Tests anzuwenden (Petrova et al., 2020). All diese Methoden müssen unter Laborbedingungen durchgeführt werden. Schnelltests zum Nachweis des RVFV sind in der Entwicklung, jedoch noch nicht im Handel (Hartmann, 2017). Gerade Schnelltests können jedoch einige Nachteile der konventionellen diagnostischen Methoden umgehen, die einen hohen Zeit- und Kostenaufwand erfordern durch teure Analysegeräte und einen hohen Bedarf an fachlich qualifiziertem Personal. Ein Lateral- Flow- Assay, welcher in dieser Arbeit hergestellt wird, kann unter normalen Bedingungen von Laien durchgeführt werden und liefert sehr schnell ein einfach abzulesendes Ergebnis. Dies ist gerade in Ländern Afrikas von großer Bedeutung, um eine Ausbreitung des Virus in der Bevölkerung oder einer Tierpopulation zu verhindern und ein rechtzeitiges Eingreifen zu ermöglichen.

2.2 Real- Time PCR

Die RT- PCR gehört zu den molekularen Testmethoden, bei welcher die Nukleinsäuren des Virus nachgewiesen werden. Dieses Verfahren ist sinnvoll während der Virämie, wobei eine quantitative RT- PCR eine genaue Diagnose mit hoher Sensitivität und Spezifität ermöglicht. Für die RT- PCR sind mehrere kommerzielle Kits im Handel erhältlich (Petrova et al., 2020). In dieser Arbeit wurde eine in- house RT- PCR mit den Primern und Sonden nach Bird et al. durchgeführt, wobei das kommerziell erhältliche Kit „QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (200)“ der Firma Qiagen verwendet wurde. Die PCR läuft in fünf Stufen unterschiedlicher Temperaturen ab. Während der ersten Stufe erfolgt die reverse Transkription, bei welcher die Virus- RNA in DNA umgeschrieben wird. In Stufe zwei wird die reverse Transkriptase inaktiviert. In der nächsten Stufe erfolgt die Denaturierung der DNA, bei welcher der Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen aufgetrennt wird. Nach der Denaturierung lagern sich die Primer in der Annealing- Phase an die entsprechenden DNA- Sequenzen an. Im letzten Schritt, der Elongation, wird durch die Polymerase der DNA- Strang vervollständigt und amplifiziert. Stufe 3 bis 5 wird 44 Mal durchgeführt, es ergeben sich demnach 44 Zyklen. Die Messung des Ergebnisses ist fluoreszenzbasiert, es wird also ein Fluoreszenzfarbstoff (FAM) zur Quantifizierung verwendet (Bird et al., 2007).

2.3 Sandwich ELISA

Beim Sandwich ELISA wird das Antigen von zwei Antikörpern an verschiedenen Epitopen gebunden. Dazu wird die ELISA-Platte mit dem primären Antikörper („Capture Antibody“) beschichtet und anschließend mit der zu untersuchenden Probe (zum Beispiel Antigen oder Virus) inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper („Detection Antibody“), der in der Regel mit einem Enzym konjugiert ist und eine quantitative Auswertung ermöglicht. In Abbildung 1 erkennt man das Schema eines solchen ELISA, wobei das Substrat von dem an den sekundären Antikörper gekoppelten Enzym umgesetzt wird, was zu einem Farbumschlag führt.

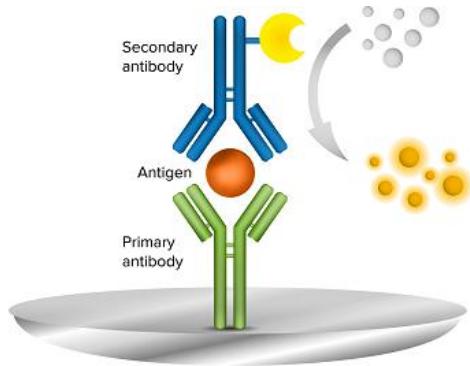


Abbildung 1: Schema eines Sandwich- ELISA (Molecular Devices, 2023)

In dieser Arbeit wurde ein Sandwich- ELISA, modifiziert nach Bormann durchgeführt, bei welchem als Capture Antibody die monoklonalen Antikörper (mAB) Gn32 und NP107 dienten. Als Probe diente sowohl das entsprechende Gn- und NP- Antigen, als auch inaktive und aktive RVF Virusstämme. Die sekundären Antikörper Gn168 und NP9 wurden an ein Enzym, die Meerrettich- Peroxidase, gekoppelt und dienten als Detection Antibodies. Durch Zugabe eines Substrates, welches vom gekoppelten Enzym umgesetzt wird, entsteht ein messbarer Farbumschlag, welcher im Photometer quantifiziert wird (Bormann, 2018).

2.4 Lateral- Flow- Assay

Der Lateral- Flow- Assay (LFA) oder auch Lateral- Flow- Immunoassay ist ebenfalls eine Methode, die sich die Antikörper- Antigen- Bindungen zunutze macht. Er ist ein einfacher tragbarer Test und kann direkt vor Ort durchgeführt werden (Point- of- care- test). Die Durchführung muss demnach nicht im Labor erfolgen (Chotithammakul et al., 2021). Der LFA findet in verschiedenen diagnostischen Bereichen Anwendung und wird im Bereich der Biomedizin, Landwirtschaft und Umwelt- und Lebensmittelwissenschaft angewandt (Koczula, Gallotta, 2016). Eine der bekanntesten Anwendungen ist der Schwangerschaftstest. Doch auch zum Nachweis von Krankheitserregern und Kontaminationen, als Drogentest oder zur Erkennung von Organversagen wird er herangezogen. Auch in der Lebensmittelindustrie wird diese Methode zum Nachweis von toxischen Verbindungen in Lebens- oder Futtermitteln verwendet (Fahlandt, 2016). Der LFA ist grundsätzlich ein papierbasiertes Analysesystem, bei dem das Ergebnis nach 5- 30 min ohne weitere Hilfsmittel abgelesen werden kann. Abbildung 2 veranschaulicht das Funktionsprinzip eines LFA.

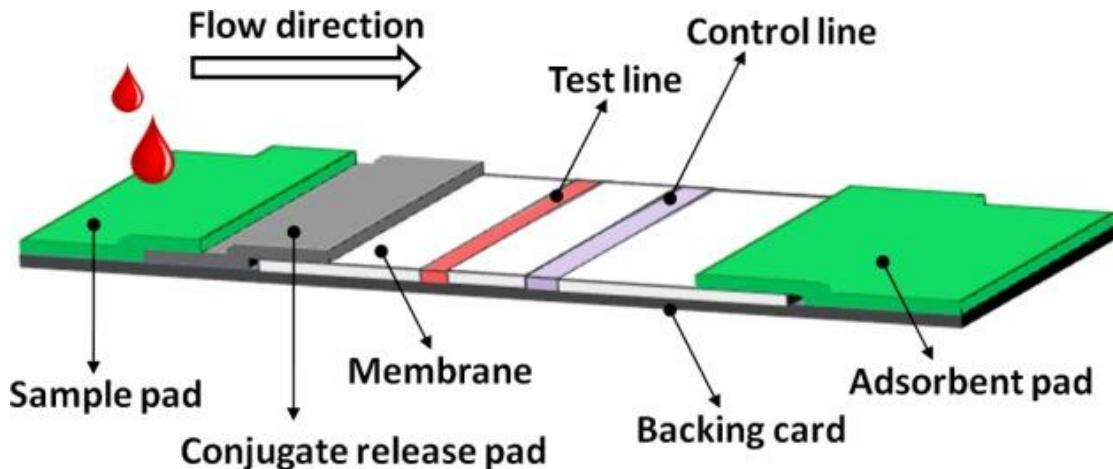


Abbildung 2: Schema eines Lateral- Flow- Assays (Koczula, Gallotta, 2016)

Die Probe bewegt sich dabei durch Kapillarkräfte durch die verschiedenen Bereiche des Polymerstreifens, an welchen Moleküle gebunden sind, die mit dem Analyten reagieren. Dazu wird die Probe auf das Sample Pad gegeben, wodurch der „laterale Fluss“ des Probenmaterials in Laufrichtung beginnt und zu dem Konjugatpad (in Abb. 2 Conjugate release pad) gelangt und es überströmt. Dieses enthält spezifische Antikörper, welche an farbige Partikel gebunden sind, in diesem Fall kolloidales Gold. Die Probe bindet an den markierten Antikörper und der Komplex aus beidem wandert über die Membran, welche auf einer Backing card fixiert ist. Die Membran besteht meist aus Nitrozellulose. Auf dieser ist auf Höhe der Testlinie ein zweiter Antikörper fixiert, an welchen der Antigen- Antikörper-Komplex bindet, wodurch dieser an der Stelle angereichert wird und ein sichtbares Signal produziert. Die Kontrolllinie zeigt an, dass der Teststreifen ordnungsgemäß funktioniert. Die größte Schwierigkeit beim Herstellen eines solchen LFA besteht in der optimalen Einstellung aller verschiedenen Komponenten und Materialien (Koczula, Gallotta, 2016).

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

In Tabelle 1 sind alle Geräte und Materialien aufgelistet, welche für die Versuche dieser Arbeit relevant waren.

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät/ Material	Modellbezeichnung	Hersteller	Herstellersitz/ Land
Mikrotiterplatte	Nunc- Immuno™ 96 MicroWell™MaxiSorp™	ThermoFisher Scientific	Waltham/ USA
ELISA- Washer	HydroFlex™ Mikroplatten Washer	Tecan	Männedorf/ Schweiz
ELISA- Reader	Infinite® 200 Pro	Tecan	Männedorf/ Schweiz
Sicherheitswerkbänke	Safe 2020 1.8 Heraeus Kendro HS 12	ThermoFisherScientific Heraeus	Waltham/ USA Hanau/ Deutschland
Präzisionswaage	M- power AZ3102	Sartorius	Göttingen/ Deutschland
Analysenwaage	M- pact AX224	Sartorius	Göttingen/ Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5430 R	Eppendorf	Hamburg/ Deutschland
Dialysemembran	ZelluTrans 12,0 Art Nr: E672.1; MWCO: 12000-14000 Dalton	Roth®	Karlsruhe/ Deutschland
Spektrophotometer	Nanodrop 2000 c	ThermoFisher Scientific	Waltham/ USA
Peroxidase- Kit	EZ- Link™ Plus Activated	ThermoFisher	Waltham/ USA

	Peroxidase Kit	Scientific	
LFA- Membran	Hi- Flow™ Plus 180 Membrane Cards	Merck Millipore	Burlington/ USA
LFA- Konjugatpad	Glass Fiber Conjugate Pad	Merck Millipore	Burlington/ USA
LFA- Sample Pad/ Absorbent Pad	Cellulose Fiber Sample Pad	Merck Millipore	Burlington/ USA
Filterrörchen für Aufkonzentrierung	Amicon Ultra-15 Zentrifugen Filtereinheiten	Merck Millipore	Burlington/ USA
PCR Cycler	CFX96™ Real-Time System	Bio- Rad	Hercules/ USA
PCR- Platten Zentrifuge	Perfect Spin P	VWR International- Peqlab	Radnor/ USA
Zentrifuge für RNA-Extraktion	Centrifuge 5430 R	Eppendorf	Hamburg/ Deutschland
RNA- Extraktionskit	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50)	Qiagen	Venlo/ Niederlande
qPCR- Kit	QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (200)	Qiagen	Venlo/ Niederlande

Tabelle 2 enthält alle relevanten Chemikalien, welche für die einzelnen Versuche verwendet wurden.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller	Herstellersitz/ Land
Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	9127.1	Roth®	Karlsruhe/ Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin), biotinfrei	0163.4	Roth®	Karlsruhe/ Deutschland
ABTS (2,2-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))	002024	ThermoFisher Scientific	Waltham/ USA

SDS (Natriumdodecylsulfat)	2326.2	Roth®	Karlsruhe/ Deutschland
Gold Colloid 40 nm	EM.GC40	BBI Solutions	Crumlin/ UK
Goat Anti- Mouse IgG	BA-9200	Vector	Newark/ Deutschland

3.1.2 Reagenzien und Lösungen für den Sandwich ELISA

Um den PBS- Puffer herzustellen, wurden 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat und 1,15 g Di- Natriumhydrogenphosphat Dihydrat eingewogen und mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt. Der 0,05 molare Carbonatpuffer wurde hergestellt, indem 4,201 g Natriumhydrogencarbonat und 5,3 g Natriumcarbonat eingewogen, und mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt wurden. Der Waschpuffer bestand aus PBS mit 0,05 % Tween ® 20. Für die Blockierungslösung wurden 2 % BSA (bovines Serum Albumin) in PBS gelöst. Für die Stopplösung wurde eine 1 %- ige Lösung von Natriumdodecylsulfat (SDS) in Reinstwasser hergestellt. Das ABTS, welches als Substratlösung fungierte, war eine gebrauchsfertige Lösung.

3.1.3 Reagenzien und Lösungen für den LFA

Für den Boraxpuffer (100 mM) wurden 9,53 g Natriumtetraborat in einem 250 ml Messkolben eingewogen und mit Reinstwasser auf 250 ml aufgefüllt. Für die BSA in PBS- Lösung mit 10 mg/ ml wurden 0,5 g BSA eingewogen und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Um die 1 mg/ ml BSA in PBS Lösung herzustellen, wurden 0,05 g BSA eingewogen und ebenfalls auf 50 ml aufgefüllt. Außerdem wurde eine Kaliumcarbonatlösung mit 100 mM angesetzt. Des Weiteren wurden folgende Antikörper, Antigene und Virusstämme verwendet:

Primäre monoklonale Antikörper:

anti- RVFV Gn mAB 32 (Gn 32)

anti- RVFV NP mAB 107 (NP 107)

Sekundäre monoklonale Antikörper:

anti- RVFV Gn mAB 168 (Gn 168)

anti- RVFV NP mAB 9 (NP 9)

rekombinante Proteine/ Antigene:

Gn Protein (Konzentration: 92 µg/ ml)

NP Protein (Konzentration: 4,365 mg/ ml)

Gc RVFV (Konzentration: 82 µg/ ml, Negativkontrolle)

Modifizierte Virusimpfstämme:

MP12 RVFV, Clone 13 RVFV (Proben)

Batai Virus, Bunyamwera Virus (Negativkontrollen)

3.2 Dialyse der Antikörper und Konzentrationsbestimmung

Für die Durchführung der Versuche mussten zuerst die zu verwendenden monoklonalen Antikörper mittels Dialyse aufgereinigt werden. Um die Gn- Antikörper zu dialysieren, wurde Reinstwasser in Bechergläsern auf 4 °C gekühlt. Währenddessen wurden die Dialyseschläuche in Reinstwasser für 20 min eingeweicht. Anschließend wurden die Schläuche in dem Wasser gespült und die unteren Enden mit Klemmen verschlossen. Die Antikörper- Lösungen wurden mit Pipetten in die Schläuche gefüllt, wobei der erste Schlauch den Antikörper „anti- RVFV Gn mAB 168“ (Gn 168), während der zweite den Antikörper „anti- RVFV Gn mAB 32“ (Gn 32) beinhaltete. Die Antikörper lagen als Zellkulturerstand (ZKÜ) mit verschiedenen Konzentrationen vor, weshalb nach der Dialyse eine Konzentrationsbestimmung vorgenommen werden musste. Die befüllten Schläuche wurden auch am oberen Ende mit Klemmen verschlossen, in die Bechergläser gelegt und für mindestens 24 h bei 4 °C unter Rühren dialysiert. Während der 24 h wurde das Reinstwasser in den Bechergläsern zwei Mal ausgetauscht. Nach der Dialyse wurden die Antikörper- Lösungen entnommen und in 5 ml Schraubgefäß überführt. Die Konzentrationen wurden mittels Nanodrop 2000 bestimmt, wobei der Blindwert aus Reinstwasser bestand. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Konzentrationen der Gn- Antikörper nach Dialyse

Antikörper- Bezeichnung	Messung 1 in mg/ ml	Messung 2 in mg/ ml	Arithmetisches Mittel in mg/ ml
Gn 32	1,30	1,26	1,28
Gn 168	3,11	3,13	3,12

Die Gn 32- Antikörperlösung wurde mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 1 mg/ ml eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Die gleiche Prozedur wurde für die NP- Antikörper „anti- RVFV NP mAB 107“ (NP 107) und „anti- RVFV NP mAB 9“ (NP 9) wiederholt. Diese Lösungen verschiedener Konzentrationen wurden wie bei dem Gn- Antikörper zusammengeführt, dialysiert und die entstandene Konzentrationen gemessen. Es ergaben sich folgende Werte im Nanodrop 2000:

Tabelle 4: Konzentrationen der NP- Antikörper nach Dialyse

Antikörperbezeichnung	Messung 1 in mg/ ml	Messung 2 in mg/ ml	Arithmetisches Mittel in mg/ ml
NP 107	1,06	1,05	1,06
NP 9	2,13	2,19	2,16

Da die Konzentration des NP 107 Antikörpers, in Tabelle 4 zu sehen, bereits etwa 1 mg/ ml betrug wurde dieser nicht weiter verdünnt. Dieser, sowie der Gn 32 wurden als primäre Antikörper im ELISA verwendet.

3.3 Peroxidase- Kopplung

Um von der Gn 168- Antikörperlösung eine Konzentration von 1 mg/ ml zu erhalten, mussten etwa 320 µl der Lösung auf 1 ml mit Reinstwasser aufgefüllt werden. Diese 320 µl wurden in ein 1,5 ml Eppi pipettiert und für die Peroxidase- Kopplung bei -70 °C tiefgefroren. Am nächsten Tag wurde der gefrorene Antikörper für 2,5 h lyophilisiert. Für die Kopplung des Antikörpers an das Enzym Peroxidase wurde das EZ- Link™ Plus Activated Peroxidase Kit verwendet. Zuerst wurde das feste PBS in eine 500 ml Flasche gegeben und anschließend mit 500 ml Reinstwasser gelöst. Dies wurde für den Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Zu dem gefriergetrockneten Antikörper wurde 1 ml der PBS- Lösung gegeben. Zu der bereits in 1 mg Portionen abgefüllten lyophilisierten Peroxidase wurden 100 µl Reinstwasser gegeben. Die Antikörper- PBS- Lösung wurde dann zu der Peroxidase gegeben. Unter einem Abzug wurden sofort 10 µl Natriumcyanoborhydrid dazugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden 20 µl Löschpuffer dazugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Das fertige Konjugat wurde bei 4 °C gelagert.

Dieselbe Durchführung wurde für den NP 9 Antikörper wiederholt. Da bei diesem die Ausgangskonzentration mit 2,16 mg/ ml niedriger lag als die des Gn 168 Antikörpers mit 3,116 mg/ ml, wurden für die Peroxidase- Kopplung 463 µl des Antikörpers eingefroren und lyophilisiert. Nach der Zugabe von 1 ml PBS betrug die Konzentration daraufhin ebenfalls 1 mg/ ml.

3.4 Sandwich- ELISA

Um zu prüfen, ob die Bindung von Antikörper an die entsprechenden Antigene funktioniert, wurde im Vorfeld ein Sandwich- ELISA durchgeführt. Als primärer Antikörper, mit dem die Platte beschichtet wurde, wurde der Gn 32 Antikörper mit einer Konzentration von 1 mg/ ml genutzt. Als Probe, beziehungsweise Antigen, wurde das Gn- Antigen mit einer Konzentration von 92 µg/ ml verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde der Peroxidase-gekoppelte Gn 168 mit einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ ml genutzt. Zuerst wurde die Platte mit 200 µl pro well des primären Antikörpers beschichtet, wobei dieser in einer Hälfte der Platte 1/ 100 und in der anderen Hälfte 1/ 500 in 50 mM Carbonatpuffer (Coatpuffer) verdünnt wurde. Für die Positivkontrollen wurde die Platte direkt mit dem Antigen statt des primären Antikörpers beschichtet. Das Antigen wurde dazu einmal 1/ 10 und einmal 1/ 100 mit dem Carbonatpuffer verdünnt, woraus sich Konzentrationen von 9,2 µg/ ml und 0,92 µg/ ml ergaben. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein Waschschritt, bei dem die wells der Platte drei Mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gespült wurden. Um freie Bindungsstellen auf der Platte zu blockieren, wurden danach 200 µl pro well der Blockierungslösung aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschvorgang. Nach dem Waschen wurden 150 µl der entsprechenden Antigen-Verdünnungen in die wells gegeben, wobei hier die Verdünnungen 1/2, 1/ 5, 1/ 10, 1/ 100, 1/ 1000 und 1/ 10000 in PBS eingesetzt wurden. Bei den Positivkontrollen, welche bereits mit Antigen beschichtet waren, wurde stattdessen nochmal die Blockierungslösung in die wells gegeben, damit diese nicht austrocknen. Als Negativkontrollen diente das NP- Antigen, welches auf eine Konzentration von 9,7 µg/ ml mit PBS verdünnt wurde, um eine ähnliche Konzentration wie die des Gn- Antigens zu erhalten. Als Blindwert wurde nur PBS- Puffer verwendet. Alle Verdünnungsstufen, sowie Positiv- und Negativkontrolle und Blindwert wurden in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Platte wurde wieder für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte wieder ein Waschvorgang. Danach wurden je 150 µl des 1/ 100 in PBS verdünnten sekundären enzymgekoppelten Antikörpers in die wells gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschritt, nach welchem je 100 µl der Substratlösung (ABTS) in die wells pipettiert wurden. Die Platte wurde für 25 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit je 100 µl Stopplösung gestoppt und bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Bei der zweiten Platte mit den NP- Antikörpern und Antigenen wurde die Platte wieder mit dem primären Antikörper (NP 107) in den Verdünnungsstufen 1/100 und 1/ 500 beschichtet,

wobei auch hier die Ausgangskonzentration 1 mg/ ml betrug. Der Peroxidase- gekoppelte sekundäre Antikörper NP 9 hatte ebenfalls die Ausgangskonzentration von 1 mg/ ml, was durch die 1/ 100 Verdünnung eine Konzentration von 10 µg/ ml ergab. Für die Positivkontrollen wurden die wells entsprechend direkt mit dem NP- Antigen beschichtet. Hier wurde die Ausgangskonzentration von 4365 µg/ ml soweit verdünnt, dass ähnliche Konzentrationen wie bei den Positivkontrollen der ersten Platte verwendet wurden. Die Konzentrationen der Positivkontrollen betrugen nach der Verdünnung 9,7 µg/ ml und 0,97 µg/ ml. Das Antigen, welches nach dem Blockieren auf die Platte gegeben wurde, wurde zuerst 1/ 45 vorverdünnt, da es dadurch mit 97 µg/ ml eine ähnliche Ausgangskonzentration wie das Gn- Antigen aufwies. Anschließend wurden dieselben Verdünnungsstufen wie bei dem Gn- Antigen verwendet (1/ 2, 1/ 5, 1/ 10, 1/ 100, 1/ 1000, 1/ 10000). Als Negativkontrolle diente das Gn- Antigen in einer Konzentration von 9,2 µg/ ml. Für den Blindwert wurde wieder PBS- Puffer verwendet.

Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und zu festigen, wurden beide ELISA- Tests einmal wiederholt, wobei zusätzlich zu den Verdünnungsstufen der Antigene noch eine unverdünnte Stufe hinzukam. Außerdem wurden alle Antigen- Verdünnungen als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Um zu prüfen, ob der ELISA- Test auch für den Nachweis von Virusstämmen in Zellkulturüberstand geeignet ist, wurde im nächsten Schritt die Methode mit inaktiviertem Virusstamm (MP 12) durchgeführt. Zur Inaktivierung wurden 2 ml des ZKÜ mit 2 ml PBS plus 1 % Tween ® 20 gemischt und für 1 h bei 56 °C erhitzt.

Die eine Hälfte der Kavitäten wurde mit dem Gn 32 Antikörper (1 mg/ ml) in einer Verdünnung von 1/ 100 in Coatpuffer und die andere Hälfte mit dem NP 107 Antikörper (1 mg/ ml) in einer Verdünnung von 1/ 500 in Coatpuffer, beschichtet. Von dem MP 12- Stamm wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten (1/ 10, 1/ 100, 1/ 1000, 1/ 10000) angefertigt, wobei die ersten Kavitäten mit unverdünnter Lösung gefüllt wurden. Als Positivkontrollen diente auf der Gn- Hälfte das Gn- Antigen (92 µg/ ml) in einer 1/ 10 Verdünnung in PBS (9,2 µg/ ml) und auf der NP- Seite das NP- Antigen (4365 µg/ ml) in einer 1/ 450 Verdünnung in PBS (9,7 µg/ ml). Als Blindwert wurde wieder PBS verwendet. Als Negativkontrolle wurde ZKÜ, welcher keinen Virus enthält, unverdünnt verwendet.

Der gleiche ELISA- Test wurde mit nicht inaktiviertem MP 12- Stamm wiederholt, wobei die Verdünnungen und Kontrollen dieselben waren, wie bei der Platte mit dem inaktivierten Stamm. Da das Material potentiell infektiös ist, wurde dieser Versuch unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

3.5 Herstellung des Goldkonjugates

Für die Herstellung des Goldkonjugates wurden im Vorfeld mehrere Versuchsansätze durchgeführt, um die richtigen Reagenzien und Volumina einzustellen. Dazu wurden verschiedene Anleitungen nach Choi et al., Wang et al. und Bormann herangezogen. Eine Fusionierung der Anleitungen nach Choi und Bormann führte zum gewünschten Ergebnis, sodass diese beiden Anleitungen modifiziert angewandt wurden. Zunächst wurde 1 ml der kolloidalen Goldlösung mit der 100 mM Kaliumcarbonatlösung auf einen pH- Wert von 9 eingestellt. Es wurden 10 µl des sekundären Antikörpers (Gn 168 1 mg/ ml in PBS/ NP 9 1 mg/ ml in PBS) dazugegeben und die Lösung auf dem Vortexer durchmischt. Dann wurden 100 µl Boraxpuffer dazugegeben und die Lösung für 30 min auf dem Schüttler bei RT bei 750 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 10 % BSA in Boraxpuffer dazugegeben und wieder auf dem Schüttler bei gleichbleibenden Parametern inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Konjugat bei 8800 rpm und 4 °C für 60 min in der Klimazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 5 % Saccharose- 1 % BSA- 0,5 % Tween 20 in PBS- Lösung resuspendiert. Das Goldkonjugat wurde nochmal auf dem Vortexer gemischt und bei 4 °C gelagert.

3.6 Durchführung des LFA

Die primären Antikörper, welche zur Erstellung der Testlinien auf den Streifen genutzt wurden, mussten zunächst aufkonzentriert werden. Dazu wurden 500 µl des Gn 32 (1 mg/ ml), sowie des NP 107 (1 mg/ ml) gefriergetrocknet. In Abbildung 3 sieht man die Struktur der Antikörper nach der Lyophilisation. Diese ist blättrig transparent und schillert leicht in verschiedenen Farben.



Abbildung 3: Gefriergetrockneter Antikörper

Anschließend wurden die gefriergetrockneten Antikörper in 50 µl Natriumcarbonatlösung 50 mM gelöst, sodass eine Konzentration von 10 mg/ ml entstand. Der Anti- Mouse- IgG- Antikörper für die Kontrolllinie wurde zunächst, da es sich um 1,5 mg Feststoff handelte, mit 1,5 ml Reinstwasser gelöst (ergab 1 mg/ ml) und anschließend 1/ 10 in 50 mM Natriumcarbonatlösung verdünnt. Die Membran wurde für die Teststreifen in 6,0 cm x 0,6 cm Streifen geschnitten. Das Konjugatpad wurde auf die Maße 2,0 cm x 0,6 cm zugeschnitten, das Sample Pad auf 1,7 cm x 0,6 cm und das Absorbent Pad auf 4,0 cm x 0,6 cm. Von dem primären Antikörper wurden 2,5 µl mit der Pipette auf die Membran aufgetragen. Von dem Anti- Mouse- IgG- Antikörper wurden ebenfalls 2,5 µl etwa einen cm über der Testlinie aufgetragen. Die Membran wurde 5 min bei RT vorgetrocknet und im Anschluss für 1 h bei 36 °C getrocknet. Danach wurde die Membran mit 1 % BSA in PBS für 30 min bei RT geblockt. Im Anschluss wurde die Membran mit Reinstwasser abgespült und zum Trocknen über Nacht auf Pipettenspitzen gelegt und bei RT getrocknet.

Das zugeschnittene Konjugatpad wurde mit einer sterilen Pipette in die Goldkonjugatlösung getaucht und vollständig vollgesogen. Anschließend wurde es genau wie die Membran auf Pipettenspitzen gelagert über Nacht bei RT getrocknet.

Am nächsten Tag wurde der LFA zusammengebaut. Dafür wurden die Klebestreifen ober- und unterhalb der Membranfläche entfernt und zuerst das Konjugatpad etwa 1 mm membranüberlappend aufgeklebt. Darüber wurde das Sample Pad aufgebracht, welches einerseits an der übrigen Klebefläche haftet und durch das Auftragen der Probe an das Konjugatpad klebt. Auf der anderen Seite (oben) wurde das Absorbent Pad, ebenfalls 1 mm membranüberlappend, aufgeklebt. Zum Schluss wurden 200 µl Probe aufgetragen und

gewartet, bis diese durchgelaufen und ein Ergebnis zu sehen war. Als Probe dienten zunächst die entsprechenden Gn- und NP- Antigene. Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, wobei PBS als Diluent diente.

Nach den Versuchen mit den Antigenen als Probe wurden die LFAs mit inaktivem und aktivem MP12- und Klon 13- Stämmen durchgeführt. Diese ZKÜ wurden für die Testdurchführungen 1/ 2 in PBS verdünnt. Da die aktiven Stämme potentiell humanpathogen sind, wurde diese Arbeit unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Als Negativkontrollen für die Virusstämme wurden zwei andere aktive Virusstämme in ZKÜ (Batai- Virus und Bunyamwera- Virus), ebenfalls 1/ 2 in PBS verdünnt, sowie virusfreies Medium verwendet.

Als Negativkontrolle für die Antigene wurde ein anderes Antigen beziehungsweise Glycoprotein, Gc, als Probe verwendet.

3.7 Virusanzucht und Aufkonzentrierung

Da die ZKÜ, die in den LFA als Probe dienten recht gering konzentriert sind, wurden beide Virusstämme neu angezüchtet und aufkonzentriert. Dazu wurden Vero 76 Zellen verwendet, welche bereits 69 Mal passagiert wurden. Bei diesen Zellen handelt es sich um Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze, welche die am häufigsten verwendete Zelllinie für die Anzucht von Viren darstellt (Kiesslich, Kamen, 2020). Diese Zellen stellte die Zellbank des FLI zur Verfügung. Sie lagern in Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff und werden für den Gebrauch aufgetaut und in 37 °C warmem Medium in Flaschen angesät. Bei dem Medium handelt es sich um ZB 5 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS). ZB 5 lag als gebrauchsfertige Lösung vor und besteht aus 5,32 g Hank's Salzen, 4,76 g Earles' Salzen, 1,25 g Natriumhydrogencarbonat, 10 ml nichtessentielle Aminosäuren und 120 mg Natriumpyruvat auf 1 l. Das FKS dient als Nährstoffzusatz, wobei das 10 %-ige zur Vermehrung und 2 %-ige FKS zur Erhaltung der Zellen eingesetzt wird. Nach etwa 24 h wird das Medium mit eventuell vorhandenen toten Zellen abgesaugt und durch frisches Medium ausgetauscht. Dann wartet man, bis sich ein dichter Zellrasen bildet. Wenn dies geschehen ist, müssen die Zellen passagiert werden.

Dazu wurde das Medium der Vero 76 Zellen, welche in einer T25 Flasche vorlagen, abgesaugt und die Flasche 2 Mal mit etwa 3 ml PBS ausgewaschen. Danach wurde 1 ml ATV-D in die Flasche gegeben und geschwenkt. Anschließend wurden 0,5 ml wieder

abgesaugt, sodass 0,5 ml ATV-D übrig blieben, welches die Zellen benetzt. Die Flasche wurde für 3 min bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Das ATV sorgt in dieser Zeit dafür, dass sich die Zellen vom Flaschenboden lösen und vereinzeln, wobei das D für eine doppelte Konzentrierung steht. Es ist eine fertige Lösung und besteht aus 8,5 g Natriumchlorid, 0,4 g Kaliumchlorid, 1,0 g Dextrose, 0,58 g Natriumhydrogencarbonat, 1,0 g Trypsin (1/250) und 0,2 g EDTA auf 1 l. Danach wurden die Zellen durch Klopfen vom Boden gelöst und 4,5 ml Medium in die Flasche gegeben und geschwenkt. In fünf neue Flaschen wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension und 7 ml Medium gegeben. Die Flaschen wurden mehrere Tage bei 37 °C im Brutschrank gelagert, bis sich ein dichter Zellrasen bildete. Für die Virusanzucht wurde das alte Medium abgesaugt und 1 ml ZB 5 mit 2 % FKS und Penicillin und Streptomycin in jede Flasche gegeben. Die Konzentration des Penicillins betrug dabei 1 µl pro 1 ml Medium und die des Streptomycins 0,5 µl pro 1 ml Medium. Anschließend wurde in zwei Flaschen je 100 µl des MP12 ZKÜ gegeben und in zwei weitere Flaschen je 100 µl des Klon 13 ZKÜ. Die fünfte Flasche wurde nicht mit Virus beimpft und diente als Negativkontrolle. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. In dieser Zeit wurden die Flaschen 4 Mal geschwenkt. Nach der Inkubation wurden in jede Flasche 9 ml Medium mit 2 % FKS und den beiden Antibiotika gegeben. Dann wurden die Flaschen bei 37 °C gelagert und jeden Tag der cytopathische Effekt unter dem Mikroskop kontrolliert. Bereits nach 4 Tagen konnte der ZKÜ der mit MP12 infizierten Zellen geerntet werden. Die Klon 13 Zellen wurden nach 7 Tagen geerntet. Durch das Mikroskop war bei beiden Virusstämmen zu dem Zeitpunkt der Ernte der zytopathische Effekt gut sichtbar.

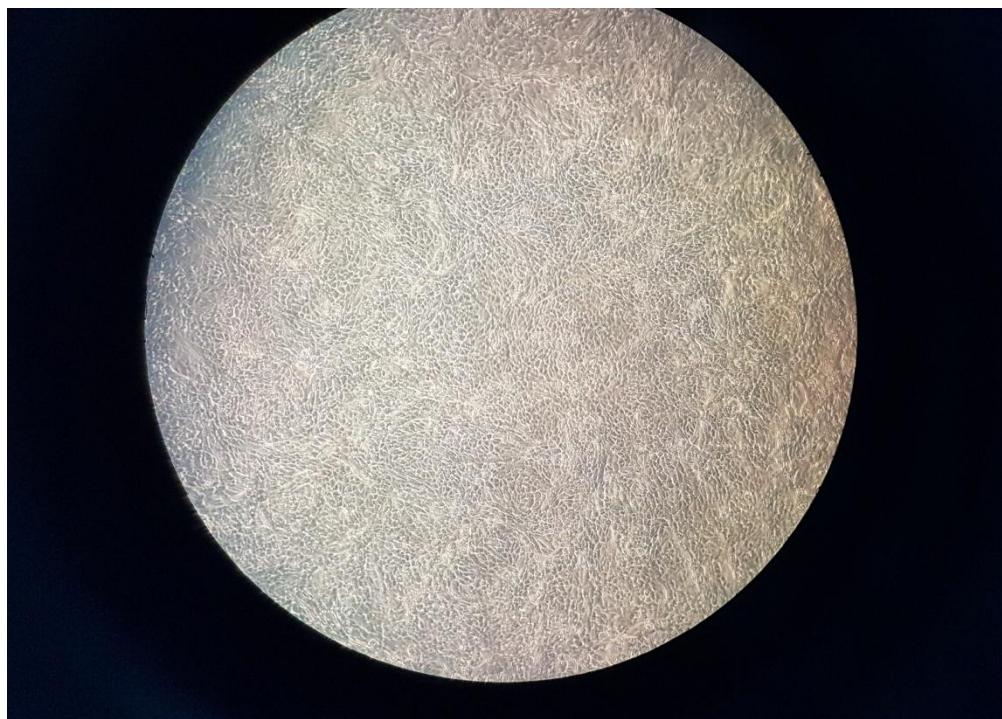


Abbildung 4: Negativkontrolle Zellzucht Tag 4

In Abbildung 4 erkennt man die Negativkontrolle, also Zellen, welche nicht mit Virus infiziert wurden. Es ist deutlich ein dichter gleichmäßiger Zellrasen zu erkennen.

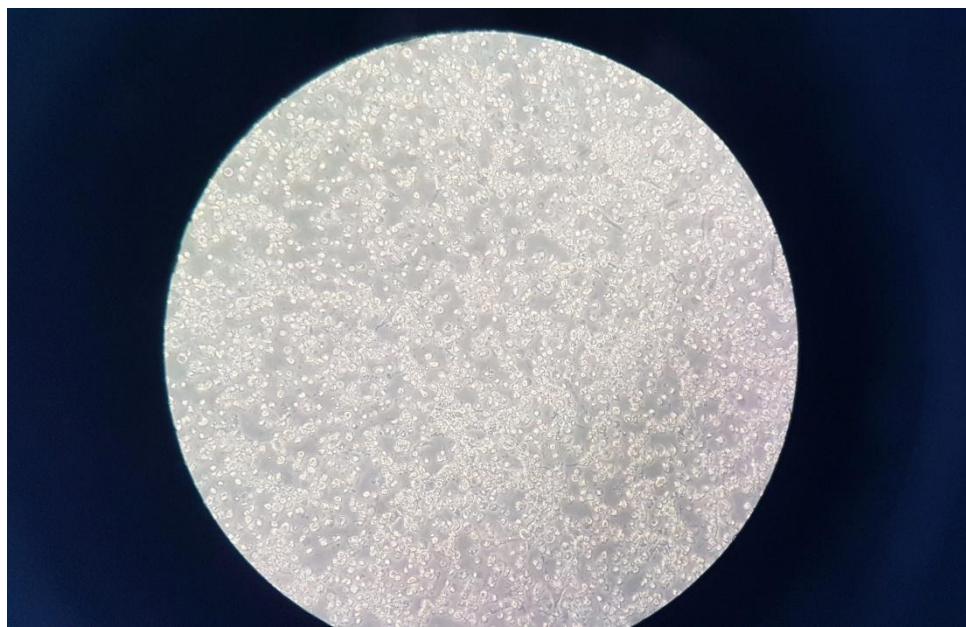


Abbildung 5: MP12- Zellen Tag 4

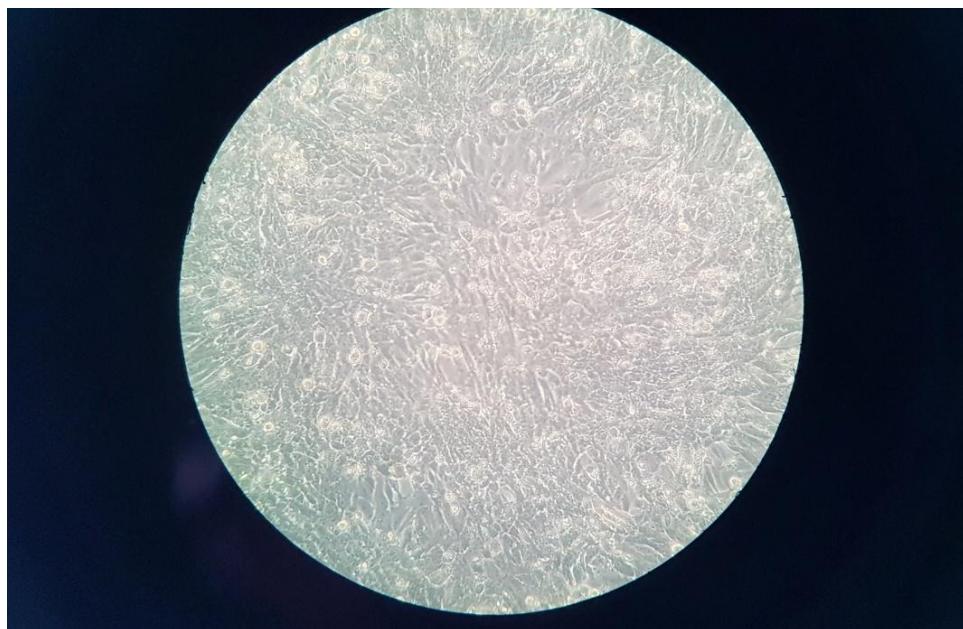


Abbildung 6: Klon 13 Zellen Tag 4

In Abbildung 5 erkennt man die Zellen, welche mit MP12 infiziert wurden, vier Tage nach dem Animpfen. Bei den Zellen ist ein deutlicher zytopathischer Effekt zu sehen, was an den Löchern im Rasen ersichtlich ist, sodass sie an Tag 4 nach Infektion geerntet werden konnten. Die Zellen, die mit Klon 13 infiziert worden waren (Abb. 6), zeigten keinen so starken zytopathischen Effekt, sodass sie erst vier Tage später geerntet wurden. Für die Ernte wurden die anhaftenden Zellen mit einem Scraper abgekratzt und das Medium mit den gelösten Zellen abgesaugt und in 15 ml Falcons überführt und bei -20 °C eingefroren. Für die Aufkonzentrierung der ZKÜ wurden diese aufgetaut und jeweils 10 ml der Suspensionen in ein Amicon Ultra- 15 Filterrörchen gegeben. Anschließend wurden diese bei 3320 g für 40 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde neue Suspension zugegeben und wieder zentrifugiert. Das Ganze wurde wiederholt, bis die ursprünglichen etwa 20 ml Suspension pro Virusstamm auf 2 ml aufkonzentriert waren. Die Virussuspensionen wurden demnach um den Faktor 10 aufkonzentriert. Für die Konzentrationsbestimmung der aufkonzentrierten Virus- ZKÜ, sowie der Ausgangs- ZKÜ wurde die quantitative Real- Time- PCR durchgeführt.

3.8 RNA- Extraktion und PCR

Um genaue Konzentrationswerte zu erhalten, anhand welcher die verschiedenen ZKÜ der Virusstämme verglichen werden können, wurde von den verschiedenen Suspensionen eine quantitative PCR durchgeführt.

Dazu musste zunächst die RNA isoliert werden. Für diese Isolierung wurde das RNA-ExtraktionskitQIAamp® Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Zuerst wurde die Carrier RNA in der AVL- Lösung gelöst. Anschließend wurden von dem Gemisch Aliquots von 560 µl in 2 ml Eppis angefertigt und eingefroren. Für den Gebrauch wurden diese Aliquots für 2 min bei 80 °C im Thermoblock aufgetaut. Dabei lösten sich die ausgefallenen Präzipitate. Danach wurden die Aliquots auf dem Vortexer gemischt, kurz zentrifugiert und 5 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Zu diesen 560 µl wurden unter der Werkbank 140 µl der Virussuspensionen gegeben, gemischt und ebenfalls kurz zentrifugiert. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden jeweils 560 µl 99,8 %-iger Ethanol dazugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Je 640 µl Probe wurde auf eine Säule pipettiert und diese bei 8000 rpm für 30 s bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Tube aus dem Kit gestellt. Der Vorgang wurde einmal wiederholt, wobei die restliche Menge der Proben auf die Säulen gegeben wurde. Anschließend wurden 500 µl AW1 Puffer auf die Säule gegeben und wieder für 30 s bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule in ein neues Tube eingesetzt. Es folgten 500 µl AW2 Puffer und eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min. Nachdem der Durchfluss wieder verworfen wurde und die Säule in ein Eppi gesetzt wurde, wurden 50 µl AVE Elutionspuffer auf die Säule gegeben und 1 min inkubieren gelassen. Das Ganze wurde nochmals für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und anschließend die Säule verworfen, da die extrahierte RNA sich nun im Durchfluss in dem Eppi befand. Dieser Vorgang wurde für alle Proben durchgeführt. Es handelte sich um 8 verschiedene Proben und eine Negativkontrolle.

Für die Durchführung der quantitativen Real- time PCR wurde das QuantiTect® Probe RT-PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Der Mastermix wurde für 29 (circa 10% Überschuss) wells nach folgendem Pipettierschema in Tabelle 5 angesetzt.

Tabelle 5: Pipettierschema für den PCR- Mastermix

Bestandteil	Volumen in μ l
QuantiTect Probe RT- PCR Master Mix	181,23
QiantiTText RT Mix	3,63
RVFV- Mix	29
H2O	76,13
Gesamtvolumen	290 (10 μl pro well)

Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Von dem fertigen Master- Mix wurden 10 μ l in jedes well pipettiert. Anschließend wurden 2,5 μ l der entsprechenden Probe dazugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und kurz zentrifugiert. Danach wurde die Platte in den PCR- Cycler gesetzt und die Analyse nach dem in Tabelle 6 aufgeführten Temperaturprogramm durchgeführt.

Tabelle 6: PCR- Cycler- Programm

Stufe	Dauer	Temperatur in °C	
1	30 min	50	
2	15 min	95	
3	15 s	95	
4	30 s	55	44x
5	30 s	72	

Die Ergebnisse der PCR sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: CT- Werte der PCR

Probe	CT- Wert (arithmetisches Mittel der Doppelbestimmung)
MP12- 1	20,50
MP12- 2	18,32
MP12- 3	15,94
MP12- 4	0,00
Klon 13- 1	20,61
Klon 13- 2	14,18
Klon 13- 3	14,20
Klon 13- 4	0,00
Negativkontrolle destilliertes Wasser	0,00
Negativkontrolle Medium	0,00

MP12- und Klon 13-1 stellen den Original- ZKÜ dar, Probennummer 2 die Konzentration der neu angezüchteten Virusstämme vor der Aufkonzentrierung, Probennummer 3 die Konzentration nach der Aufkonzentrierung und Probennummer 4 ist der Durchfluss der Aufkonzentrierung

Die CT- Werte einer PCR geben den Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der Schwellenwertlinie an. Je niedriger der CT- Wert, desto höher die Konzentration der Probensequenz, da diese bereits nach wenigen PCR Zyklen in einer nachweisbaren Menge vorhanden ist. Die Amplifikationskurve schneidet die Schwellenwertlinie also näher dem Koordinatenursprung (Thermo Fisher Scientific, 2016). Der CT- Wert des MP12 nach der Aufkonzentrierung sank um etwa zwei CT- Werte von 18,32 auf 15,94, wie man Tabelle 7 entnehmen kann. Die Konzentrierung war demnach erfolgreich. Der Durchfluss, sowie die Negativkontrollen zeigten wie erwartet ein negatives Ergebnis. Bei der Klon 13- Versuchsreihe ergab die neue Virusanzucht eine Erhöhung der Viruskonzentration, wie man am Vergleich der CT- Werte von 20,61 für den Original- ZKÜ mit 14,20 für die neu produzierten ZKÜ erkennen kann. Es kam jedoch zu keiner weiteren Aufkonzentrierung durch die Membranfiltration.

In der folgenden Abbildung 7 sind die zu der PCR gehörenden Amplifikationskurven dargestellt.

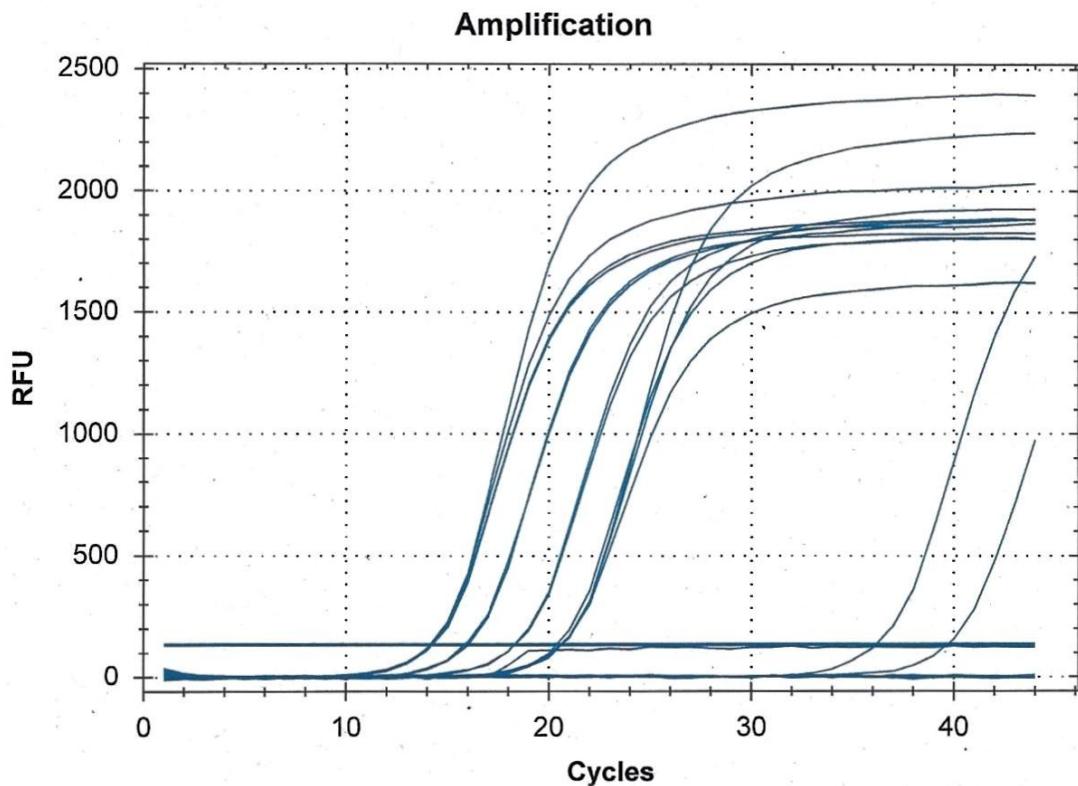


Abbildung 7: Amplifikationskurven PCR

Die X- Achse gibt hier die Zyklen an, während die Y- Achse das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes darstellt. Die Schwellenwertlinie ist parallel zur X- Achse zu erkennen. Die Kurve, welche ebenfalls parallel zur X- Achse bei dem Y- Wert null verläuft, beinhaltet die Negativkontrollen, sowie die Durchflüsse. Man erkennt die gleichmäßigen Abstände der Kurven zueinander, was man bereits der Tabelle 7 entnehmen konnte, bei welcher die CT- Werte des MP 12 beispielsweise immer einen Abstand von etwa 2 CT- Werten zueinander aufweisen.

Um genauere Konzentrationswerte zu erhalten, wurde anhand einer gegebenen Standardkurve eine Funktionsgleichung zum Errechnen der Kopienzahl erstellt.

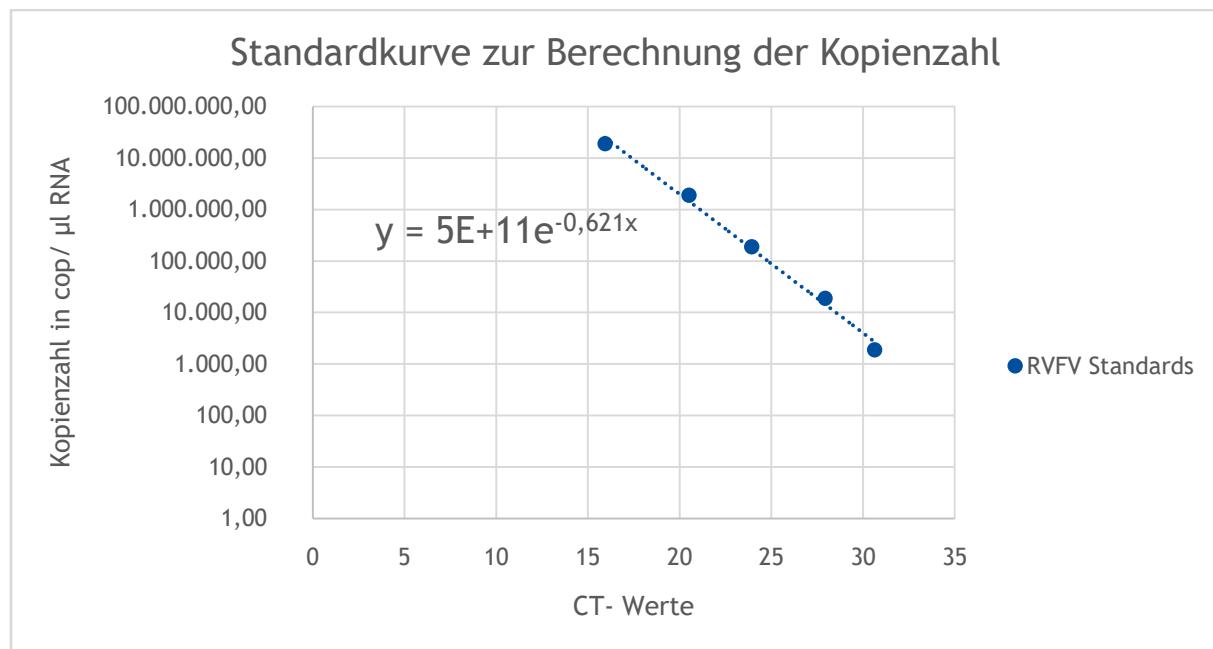


Abbildung 8: Standardkurve RVFV Standards

Anhand der in Abbildung 8 dargestellten Funktionsgleichung wurde durch das Einsetzen der erhaltenen CT- Werte als X- Wert die Kopienzahl der einzelnen Proben berechnet. Diese Werte sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Kopienzahlen der Proben

Probe	CT- Wert	Kopienzahl in cop/ µl RNA
MP12- 1	20,50	$1.479.735,53 = 1,5 \cdot 10^6$
MP12- 2	18,32	$5.729.586,58 = 5,7 \cdot 10^6$
MP12- 3	15,94	$25.118.971,00 = 25,1 \cdot 10^6$
Klon 13- 1	20,61	$1.382.029,92 = 1,4 \cdot 10^6$
Klon 13- 2	14,18	$74.932.175,48 = 74,9 \cdot 10^6$
Klon 13- 3	14,20	$74.007.273,39 = 74 \cdot 10^6$

Der Wert mit dem niedrigsten CT- Wert hat wie zu erwarten die höchste Kopienzahl pro µl RNA. Dies ist der ZKÜ Klon 13-2, also das neu angezogene Virus vor der Aufkonzentrierung mit einer Kopienzahl von $74 \cdot 10^6$ cop/ µl RNA.

Da die LFA mit dem inaktivierten MP12- Stamm gut funktionierten, wurden diese Proben ebenfalls in der PCR analysiert. Hier ergab sich ein durchschnittlicher CT- Wert von 26,92,

was zu einer Kopienzahl von $27,5 \cdot 10^3$ cop/ μl RNA führt. Dieser Wert liegt deutlich unter den Werten der aktiven Virusstämme. Jedoch lagen auch die CT- Werte der Standards und Positivkontrollen in dieser PCR wesentlich höher als in den vorherigen Durchgängen, was die Ursache für die hohen Werte sein kann.

4 Ergebnisse

4.1 Sandwich ELISA

Sowohl der ELISA- Test mit dem Gn- Antigen- Antikörper- Paar als auch der Test mit den NP- Proteinen erbrachten das erwartete Ergebnis. Mit zunehmender Antigen- Konzentration, stieg auch das Farbsignal, was bereits mit bloßem Auge zu erkennen war.

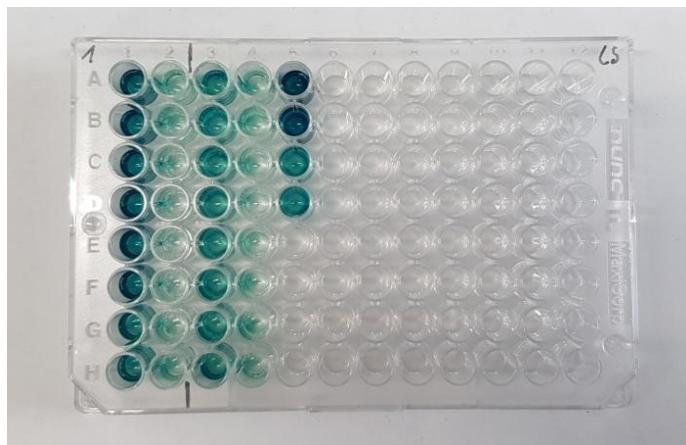


Abbildung 9: Gn- basierter ELISA

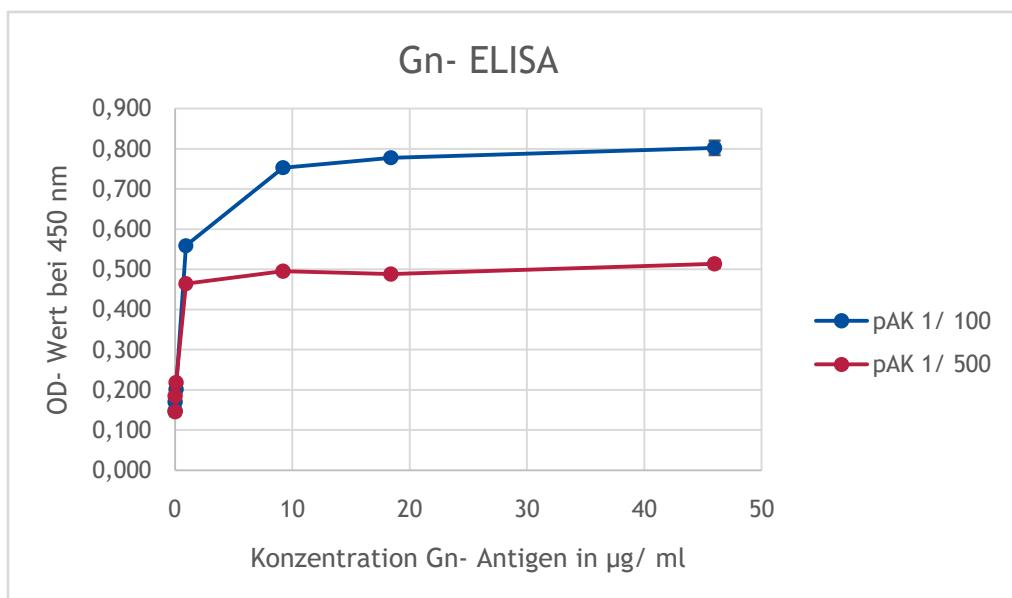


Abbildung 10: graphische Darstellung Gn- ELISA

In Abbildung 9 erkennt man die Ergebnisse des Gn- basierten ELISA- Tests in der Platte. Die Spalten 1 und 2 wurden mit dem primären Antikörper Gn 32 in der Verdünnung 1/ 100 beschichtet, also 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, die Spalten 3 und 4 mit der 1/ 500 Verdünnung, folglich 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Spalte 5 enthielt die Positivkontrollen, das Gn- Antigen als Beschichtung mit 9,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 0,97 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Konzentration des als Probe eingesetzten jeweiligen Antigens lag in Zeile 1 A bei 46 $\mu\text{g}/\text{ml}$, während die Konzentration in Zeile 1 H 0,92 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und in Zeile 2 D nur noch 0,0092 $\mu\text{g}/\text{ml}$ betrug. Man kann erkennen, dass die Abstufung zwischen den einzelnen Konzentrationen in Spalte 1 kaum wahrnehmbar waren. Es lässt sich außerdem ablesen, dass das Farbsignal bei der Beschichtung mit dem 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konzentrierten Gn 32 stärker war als bei der 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Konzentration. Diese auf bloßem Sehen beruhenden Vermutungen wurden durch die Messung im Photometer bestätigt. Das zeigt das Diagramm in Abbildung 10. Man erkennt sofort, dass die OD- Werte bei der 1/ 100 Verdünnung des primären Antikörpers höher sind, als bei der höheren Verdünnung. Der OD- Wert für die Antigenkonzentration von 46 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liegt bei der 1/ 100 Verdünnung bei 0,8 und bei der 1/ 500 Verdünnung bei 0,5. Bei der höheren Verdünnung steigen die OD- Werte bis zu einer Antigenkonzentration von etwa 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ an und bleiben anschließend trotz steigender Konzentration auf einem konstanten Level. Bei der 1/ 100 Verdünnung des primären Antikörpers ist bei der Erhöhung der Antigenkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ noch ein Anstieg des OD- Wertes zu erkennen, danach jedoch steigen auch hier die Werte der Farbintensität nicht mehr weiter an.

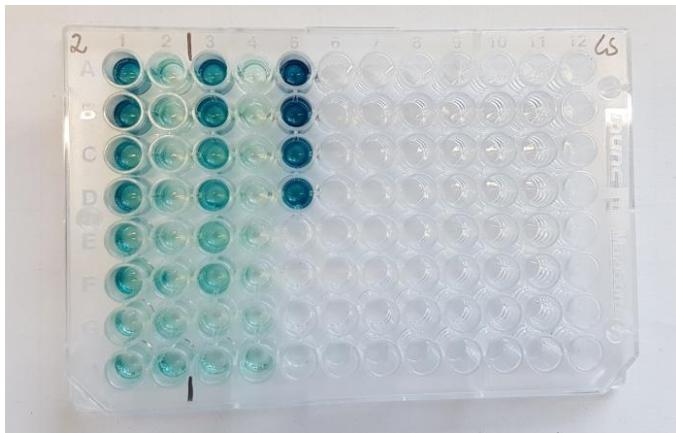


Abbildung 11: NP- basierter ELISA

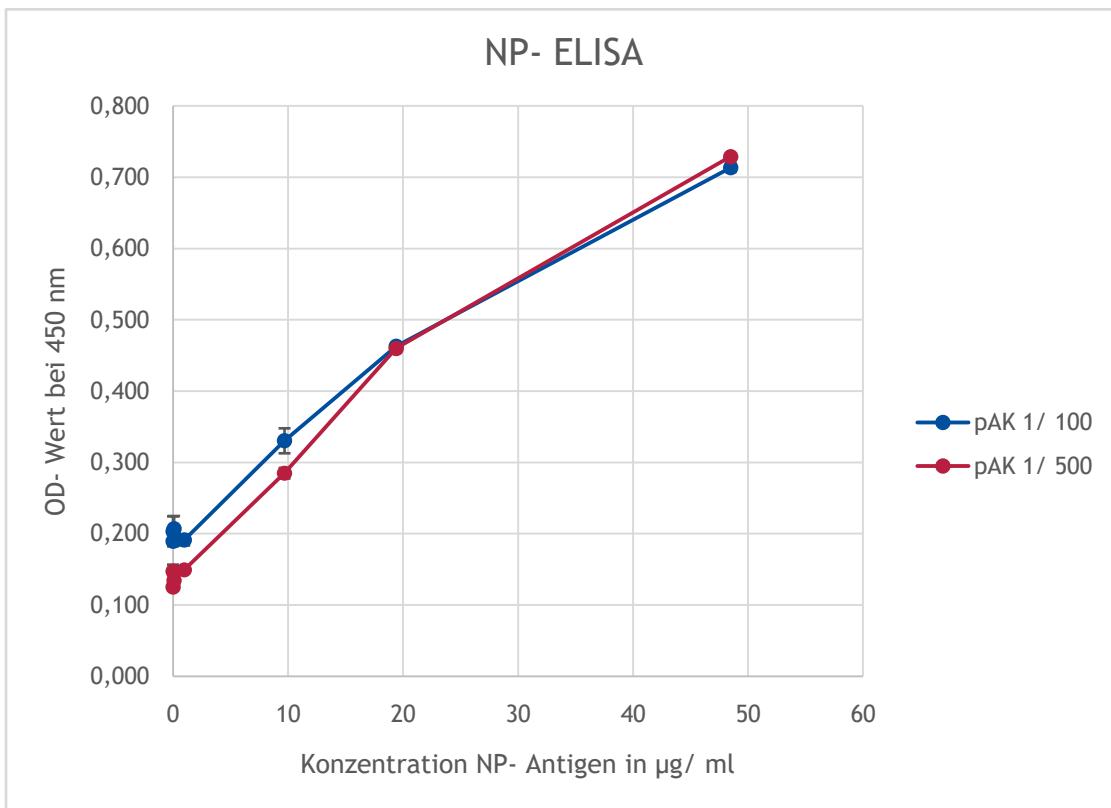


Abbildung 12: graphische Darstellung NP- ELISA

In Abbildung 11 sind die sichtbaren Ergebnisse des NP- ELISAs in der Mikrotiterplatte dargestellt, welche die gleiche Belegung wie der Gn- basierte ELISA aufwies. Man erkennt sofort, dass in diesem ELISA die Farbabstufungen in Spalte 1 deutlicher zu erkennen sind als bei dem Gn- ELISA. Außerdem scheint die Konzentration des primären Antikörpers NP 107 keinen Einfluss auf die Stärke des Farbsignals zu haben. In der 1/ 100 Verdünnung betrug die Konzentration ebenfalls 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und in der 1/ 500 Verdünnung 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Diese Beobachtungen decken sich mit den Werten des Diagrammes in Abbildung 12. Beide Graphen mit den unterschiedlich konzentrierten primären Antikörpern liegen nah beieinander.

Außerdem ist in diesem Fall ein linearer Anstieg der OD- Werte von 0,2 auf 0,7 mit steigender Antigenkonzentration ersichtlich. Demnach ist die Abstufung zwischen den verschiedenen Konzentrationsstufen hier konstanter als bei dem Gn- ELISA.

Bei dem Gn- ELISA ist demnach eine Sättigung der Antigen- Antikörperbindung bereits bei 10 µg/ ml erreicht, während bei dem NP- ELISA ein linearer Anstieg der OD- Werte bis zu einer Antigenkonzentration von circa 50 µg/ ml zu verzeichnen ist. Im Anschluss wurden die Sandwich- ELISAs mit dem inaktivierte MP12 ZKÜ mit einem CT- Wert von 26,92 und einer Kopienzahl von $27,5 \cdot 10^3$ cop/ µl RNA durchgeführt. Das Ergebnis der Platte ist in Abbildung 13 zu sehen.

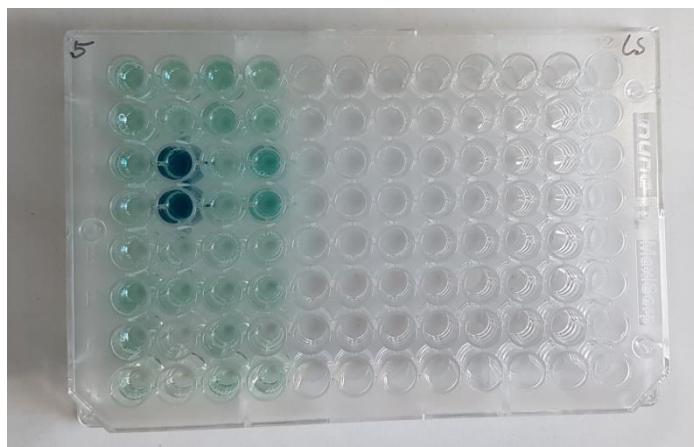


Abbildung 13: ELISA mit inaktiviertem MP12

Die vier dunkler gefärbten wells C2/ D2 und C4/ D4 enthielten die Positivkontrollen. In allen anderen Kavitäten sind keine Farbabstufungen zu erkennen. Außerdem sind die Werte alle negativ, obwohl der ZKÜ teilweise unverdünnt eingesetzt wurde. Es konnte demnach keine Bindung der Antikörper an das Virus nachgewiesen werden.

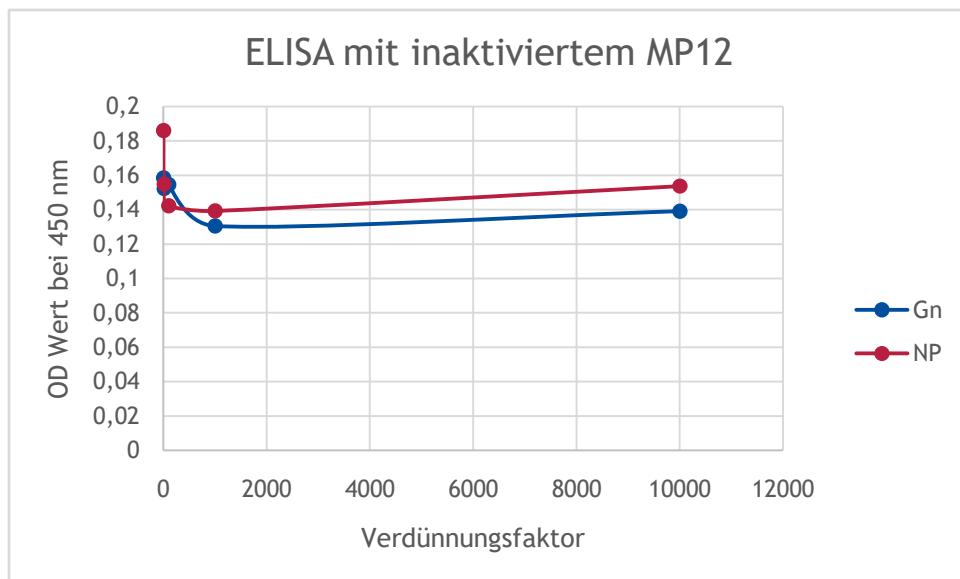


Abbildung 14: graphische Darstellung ELISA mit inaktiviertem MP12

Das Diagramm in Abbildung 14 zeigt das Ergebnis deutlich. Es ist keine Abhängigkeit zwischen der Probenkonzentration und den OD- Werten ersichtlich. Die OD- Werte sind so gering, dass keine Aussagekraft besteht. Den höchsten OD- Wert besitzt die Negativkontrolle mit einem Wert von 0,186.

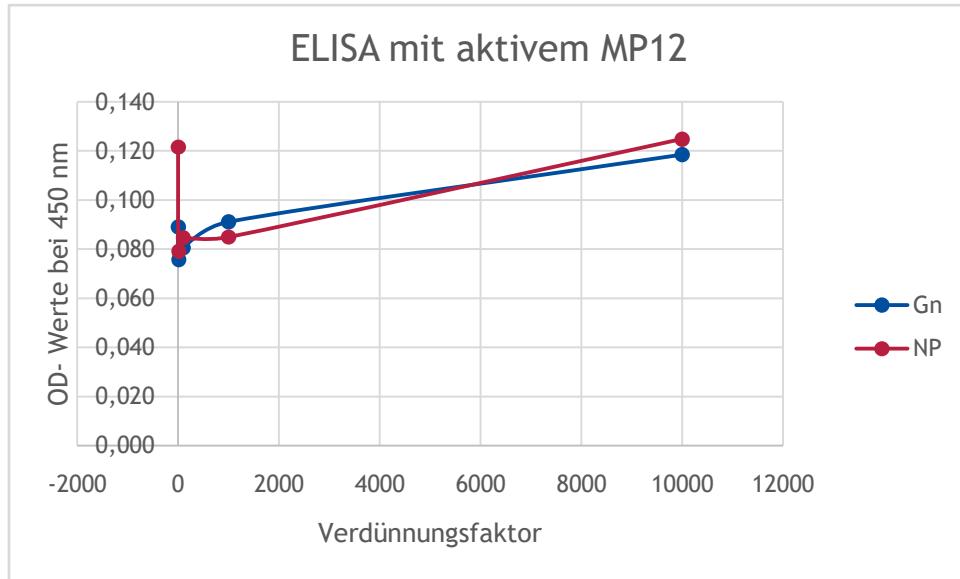


Abbildung 15: graphische Darstellung ELISA mit aktivem MP12

In Abbildung 15 erkennt man die Ergebnisse des ELISA- Tests mit dem nicht inaktivierten MP12 ZKÜ, welcher einen CT- Wert von 20,5 und eine Kopienzahl von $1,5 \cdot 10^6$ cop/ μl RNA aufwies. Das Ergebnis ist ähnlich dem inaktiven MP12. Auch hier sind die Werte sehr niedrig und zeigen keine Korrelation. Genau wie vorher stellt die NP- Negativkontrolle den höchsten Wert dar.

4.2 Lateral- Flow- Assay

Nach den Vorversuchen, in welchen die Zusammensetzung des Goldkonjugates und die Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper angepasst wurden, ist es gelungen, funktionierende LFA- Streifen herzustellen. Zunächst wurden die Streifen, wie auch die ELISA- Tests mit den entsprechenden Antigenen als Probe getestet.

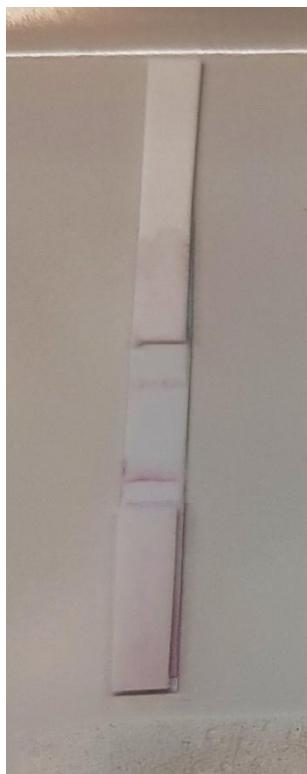


Abbildung 16: Gn- LFA, Probe Antigen 1/ 10



Abbildung 17: NP- LFA, Probe Antigen 1/ 10

In Abbildung 16 und 17 erkennt man jeweils einen Gn- LFA und einen NP- LFA mit deutlich sichtbaren Kontroll- und Testbanden. In beiden Fällen wurde das entsprechende Antigen 1/ 10 in PBS verdünnt und in Konzentrationen von $436,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ für NP und $9,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ für Gn aufgetragen. Man erkennt im Vergleich der Abbildungen, dass die Testbande des schwächer konzentrierten Gn- Streifens stärker sichtbar ist, als die des NP- Streifens. Im Anschluss wurden Verdünnungsreihen der Antigene hergestellt und auf den jeweiligen Teststreifen untersucht.

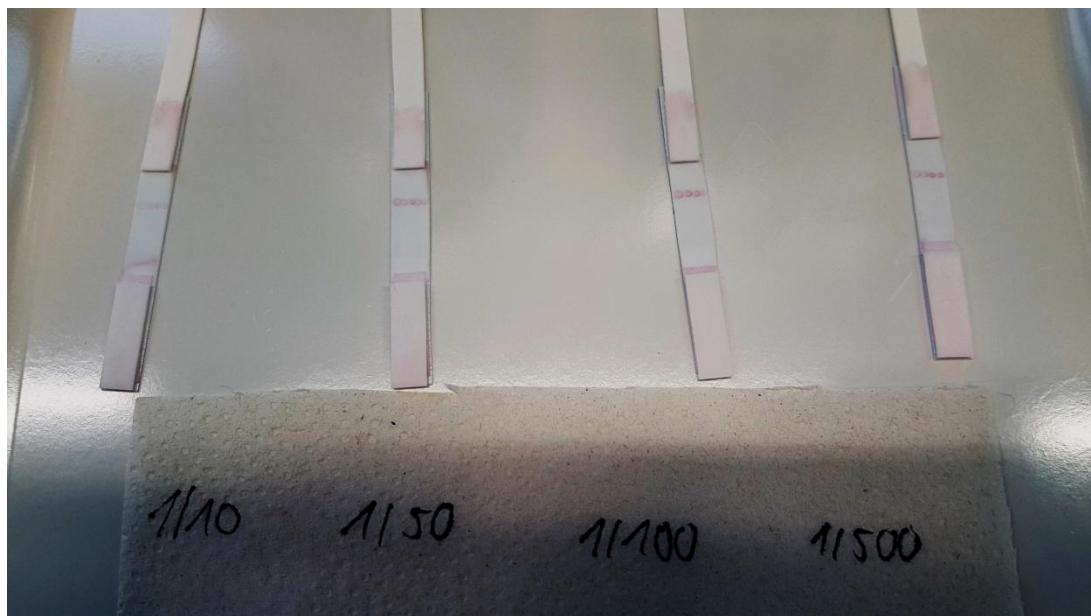


Abbildung 18: Gn- Antigenverdünnungsreihe

In Abbildung 18 sind die LFA der Gn- Antigenverdünnungsreihe dargestellt. Alle Streifen wiesen starke Kontrollbanden auf, was auf die Funktionalität der Streifen schließen lässt. Bei der 1/ 10 Verdünnung mit einer Konzentration von 9,2 µg/ ml ganz links ist eine sehr starke Testbande zu sehen, während diese in den nächsten beiden Verdünnungsstufen 1/ 50 (Konzentration 1,84 µg/ ml) und 1/ 100 (Konzentration 0,92 µg/ ml) nur noch sehr schwach zu erkennen ist. Jedoch sind auch bei diesen Konzentrationen noch Testbanden sichtbar. In der letzten Verdünnungsstufe von 1/ 500 (Konzentration 0,184 µg/ ml) ist keine Testbande erschienen. Man erkennt außerdem gut, dass, je stärker die Testbande, desto schwächer erscheint die Kontrollbande, da bei einer starken Kontrollbande weniger Goldpartikel für die Kontrolllinie zur Verfügung stehen.

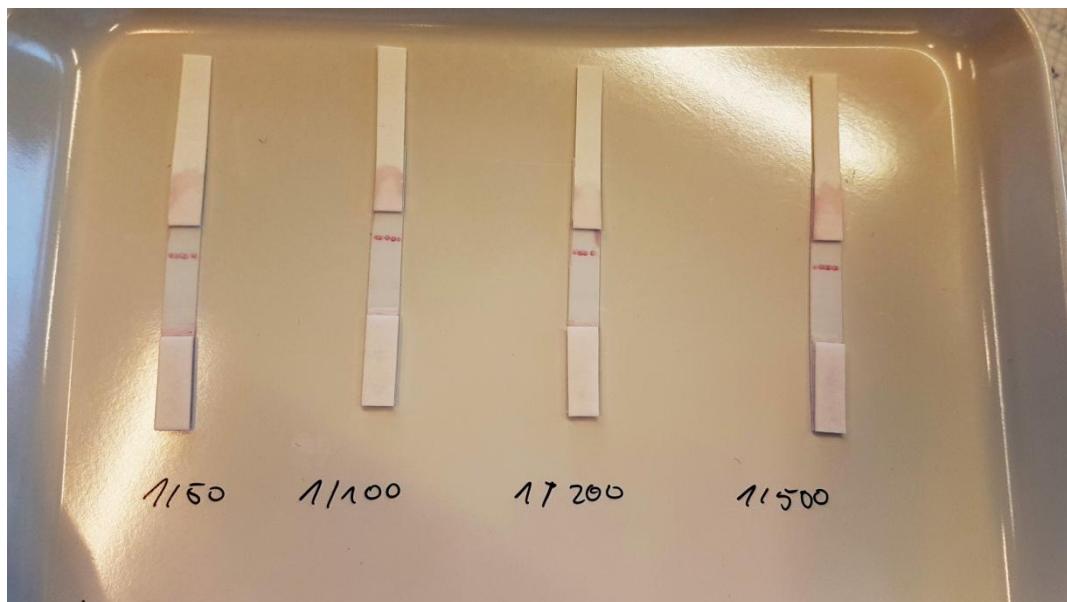


Abbildung 19: NP- Antigenverdünnungsreihe

In Abbildung 19 ist das Ergebnis der NP- Antigenverdünnung dargestellt. Aufgrund der höheren Konzentration des Antigens wurde hier bei der 1/ 50 Verdünnung, also einer Konzentration von 87,3 µg/ ml, begonnen. Die Konzentration der 1/ 100 Verdünnung betrug 43,65 µg/ ml, die der 1/ 200 Verdünnung 21,83 µg/ ml und die der 1/ 500 Verdünnung 8,73 µg/ ml. Bei den ersten drei Verdünnungen ist eine sehr schwache Testbande zu erkennen, in der 1/ 500 Verdünnung ist nur die Kontrollbande ersichtlich. Jedoch sind keine Abstufungen zwischen den drei verschieden konzentrierten Proben zu erkennen, da die Banden dazu zu schwach sind. Als Negativkontrolle zu den beiden Antigenen wurde ein weiteres RVFV Antigen verwendet, welches jedoch nicht an die Antikörper binden sollte. Das Ergebnis der LFA mit diesem Protein war wie erwartet negativ.

Im Anschluss folgten die Testdurchführungen mit dem inaktivierten MP12- RVFV- Impfstamm mit dem CT- Wert von 26,92 und der Kopienzahl von $27,5 \cdot 10^3$ cop/ µl RNA.

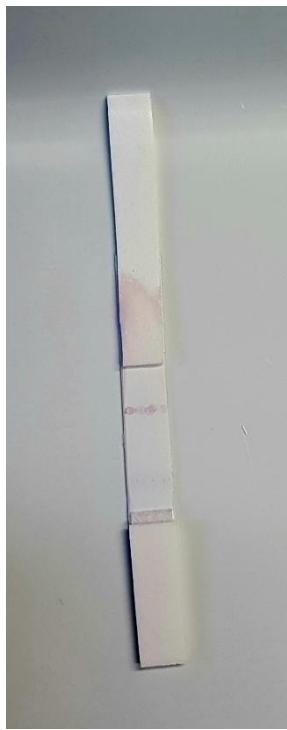


Abbildung 20: Gn- LFA MP12 inaktiv



Abbildung 21: NP- LFA MP12 inaktiv

In Abbildung 20 ist das Ergebnis des Gn- LFA, in Abbildung 21 das des NP- LFA zu sehen. Bei dem Gn- Streifen zeigte sich erst nach einer Wartezeit von 1,5 h eine schwache Testbande. Diese ist jedoch eindeutig zu erkennen. Bei dem NP- Teststreifen bildete sich die Testlinie sofort nach Durchlaufen der Lösung. Der Versuch, die LFA- Streifen mit einem Virusstamm zu testen, war demnach erfolgreich.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Versuche mit dem aktiven MP12- Virusstamm zu entnehmen, welcher einen CT- Wert von 20,5 mit einer Kopienzahl von $1,5 \cdot 10^6$ cop/ μl RNA aufwies.



Abbildung 22: Gn- LFA MP12 aktiv



Abbildung 23: NP- LFA MP12 aktiv

Beide LFA mit aktivem MP12- Stamm waren positiv, wobei der Gn- LFA in Abbildung 22 eine schwächere Testbande zeigte, als der NP- LFA in Abbildung 23. Die Kontrolllinien sind bei beiden Streifen deutlich sichtbar. Das gleiche Ergebnis erzielten die Durchgänge, bei welchen der RVF- Virusstamm Klon 13 verwendet wurde. Auch hier ergab der Gn- LFA ein schwach positives Ergebnis, während der NP- LFA eine stärkere Testlinie hervorrief.



Abbildung 24: Gn- LFA Klon 13



Abbildung 25: NP- LFA Klon 13

In Abbildung 24 und 25 sind die positiven Ergebnisse mit dem Klon 13 als Probe zu sehen. Die Banden sind schwach zu erkennen, obwohl die NP- Testbande deutlich war. Aufgrund von Belichtungsproblemen unter der Sicherheitswerkbank, ist die Bande auf der Fotografie schwächer zu sehen.

Als Negativkontrolle zu den viralen ZKÜ diente virusfreies Medium, sowie die beiden Virusstämme Batai- Virus und Bunyamwera- Virus. Die beiden Virusstämme zeigten wie erwartet ein negatives Ergebnis. Jedoch erschien bei den NP- LFA bei der Negativkontrolle mit Medium ein positives Ergebnis. In dem folgenden Bild in Abbildung 26 ist dies deutlich zu erkennen.



Abbildung 26: NP Medium und Positivkontrolle

Der linke Streifen zeigt den NP- LFA mit Medium als Probe, der rechte zeigt die Positivkontrolle mit dem NP- Antigen.

Alle Versuche wurden mehrmals wiederholt, sodass jede Probe mindestens drei Mal getestet wurde. Es kam dabei jedoch teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die folgende Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse wieder.

Tabelle 9: LFA- Ergebnisse der einzelnen Versuche

Probe	Datum	Ergebnis
MP12 inaktiv Gn	8.12.22 10.01.23 11.01.23	Positiv Positiv Positiv
MP12 inaktiv NP	5.12.22 8.12.22 10.01.23 11.01.23	Positiv Positiv Positiv Positiv
MP12 aktiv Gn	14.12.22 15.12.22 5.01.23 24.01.23	Nicht auswertbar schwach positiv Negativ Nicht auswertbar
MP12 aktiv NP	14.12.22 05.01.23 13.01.23	Positiv Positiv Negativ

	24.01.23	Positiv
Klon 13 Gn	22.12.22 05.01.23 13.01.23	Schwach positiv Schwach positiv Schwach positiv
Klon 13 NP	22.12.22 05.01.23 13.01.23 24.01.23	Schwach positiv Positiv Schwach positiv Positiv
Medium Gn	22.12.22 05.01.23 10.01.23 11.01.23 13.01.23	Negativ Negativ Negativ Negativ Negativ
Medium NP	22.12.22 05.01.23 10.01.23 11.01.23 13.01.23 24.01.23	Negativ Positiv Positiv Schwach positiv Negativ Positiv

Die neu gezüchteten Virusstämme von MP 12 und Klon 13, sowie die aufkonzentrierten ZKÜ erzielten im LFA keine auswertbaren Ergebnisse. Die Ursache bestand darin, dass zu dem Zeitpunkt die monoklonalen Antikörper bereits denaturiert waren. Folglich wurden die LFA-Teststreifen ausschließlich mit den Original- ZKÜ durchgeführt. Für weiterführende Arbeiten müssen die Antikörper neu hergestellt und anschließend mit den konzentrierteren ZKÜ getestet werden.

5 Diskussion

Die Ergebnisse aus den ELISA- Tests zeigen, dass beide Antikörperpaarungen (Gn 32/ Gn 168 und NP 107/ NP 9) spezifisch ihre Antigene detektieren können. Im Fall des Gn- basierten ELISA erfolgt die Sättigung der Bindung bereits im Bereich von 10 µg/ ml des Antigens, während im NP- basierten ELISA eine lineare Zunahme bis zu 50 µg/ ml zu beobachten ist. Die OD- Werte beider ELISA liegen dabei im Bereich von 0,2- 0,8. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass mit den NP- Antikörpern ein größerer Messbereich abgedeckt werden kann, die Gn- Antikörper jedoch eine höhere Sensitivität besitzen. Dabei hat die Konzentration des primären Antikörpers nur bei dem Gn- ELISA einen Einfluss auf die Höhe des ELISA- Signals und führt bei höherer Konzentration zu einem Anstieg der OD- Werte. Dass die NP- Paarung generell zu höheren OD- Werten führt, wie es bei Bormann der Fall war, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Bormann, 2018). Die ELISA- Tests mit inaktiviertem und aktivem MP12 führten zu keinen auswertbaren Ergebnissen, offensichtlich aufgrund einer zu geringen Viruskonzentration. Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus den ELISA- Untersuchungen, dass beide Antikörperpaarungen für den Einsatz in einem LFA geeignet sind.

Mit den in der Arbeit genutzten Materialien und Antikörpern konnten zwei funktionsfähige Lateral- Flow- Assay- Teststreifen erfolgreich aufgebaut und etabliert werden. Zwei unterschiedliche Virusantigene, das NP- und das Gn- Protein konnten dabei mit deutlich sichtbaren Testbanden spezifisch nachgewiesen werden. Auch die Kontrollbanden waren eindeutig sichtbar. Das schwächer konzentrierte Gn- Antigen mit einer Konzentration von 92 µg/ ml führte jedoch zu stärker sichtbaren Banden als NP mit 4365 µg/ ml, weshalb NP stärker konzentriert eingesetzt wurde als Gn. Das bedeutet, dass der Gn- basierte LFA generell eine höhere Sensitivität besitzt. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der ELISA- Tests. Auch hier konnten die Gn – Antikörper Konzentrationsabstufungen im niedrigen Konzentrationsbereich nachweisen, während die Bindungen im höheren Konzentrationsbereich unspezifisch wurden. Da der LFA jedoch nur eine absolute Aussage über ein positives oder negatives Ergebnis trifft und nicht zur Quantifizierung geeignet ist, würde dies in einem kommerziellen Streifen ausreichen. Für den Nachweis von reinem Antigen sind demnach beide Antikörperpaarungen geeignet.

Beide LFA konnten zudem die RVF- Virusstämme MP 12 und Klon 13 eindeutig detektieren. Die Testbanden waren hier jedoch deutlich schwächer als bei den verwendeten Antigenen, was jedoch zu erwarten war, da die Viruskonzentration in Zellkulturüberständen niedriger ist

als reine Antigenproteine. Jedoch zeigten sich die Testbanden der Gn- Streifen in allen dieser Versuche frühestens nach 1,5 h. Bei den NP- Teststreifen erschien die Bande sofort nach Durchlaufen der Probe. Der Grund dafür ist unbekannt und lässt sich möglicherweise mit unterschiedlichen Bindungskinetiken der Gn- Antikörper an die entsprechenden Virusepitope erklären. Im Unterschied zu dem rekombinanten, bakteriell exprimierten Gn- Protein liegt das funktionelle Virusprotein im Virus in einer glykosylierten Form vor, die die schnelle Antikörperbindung behindern könnte. Auffällig ist, dass der Virusnachweis im LFA im Gegensatz zum ELISA möglich war, obwohl beide Methoden prinzipiell auf der Kopplung zwischen Antikörper und Antigen beruhen. Es gibt jedoch große Unterschiede bei der Nutzung. Sämtliche Puffer und Reagenzien, die für die Herstellung der Streifen verwendet wurden sind andere als bei den ELISA Tests. Die Kopplung des sekundären Antikörpers und der damit verbundenen Signalgebung erfolgt bei den LFA an Nanogoldpartikel statt an die Peroxidase, was zu einem völlig anderen Farbsignal führt. Außerdem sind die LFA eine Form von Chromatographie, bei der die Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern während des Durchflusses durch eine Membran stattfinden, während die Reaktionen bei den ELISA- Tests alle in einem well ablaufen.

Auffällig war auch die geringere Sensitivität der LFA beim Nachweis von aktiven Lebendviren im Vergleich zu inaktivierten Viren. Hier war der NP- LFA der Test, der häufiger positive Ergebnisse lieferte, während die Gn- basierten LFA eine deutlich geringere Sensitivität zeigten. Die NP- basierten LFA lieferten zwar mehr positive Ergebnisse bei dem aktiven MP12 als Gn, jedoch waren auch hier die Banden schlechter sichtbar. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich auf die Inaktivierungsmethode zurückführen. Durch diese Inaktivierung des Virus wird dessen räumliche Struktur geändert und in Bruchstücke geteilt. Dadurch können mehr Bindungsstellen, also Epitope für die Antikörper zugänglich gemacht und deren Affinität generell erhöht werden, was zu einer besseren Nachweisbarkeit führt. Auch Klon 13 lieferte in beiden LFA positive Ergebnisse, hier jedoch waren die Testbanden auf den NP- Streifen deutlicher und stärker sichtbar als auf den Gn- basierten Streifen. Insgesamt lieferte der NP- LFA, anders als in den Antigen- Versuchen deutlichere Testbanden als Gn. Die NP- basierten LFA weisen jedoch eine geringere Spezifität auf, was bei der Testung von reinem Zellkulturmedium beobachtet wurde. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Zellkulturmedium ein komplexes Gemisch aus verschiedenen Salzen und Proteinen darstellt, darunter fötales Kälberserum, mit denen die NP- Antikörper unspezifisch reagieren können. Auch PBS, das als Diluent eingesetzt wurde, kann eine weitere mögliche Ursache für die falsch positiven Ergebnisse sein. Ren et al. fanden

bei ihrer Studie 2021 heraus, dass PBS als Verdünnungsmittel in ihren LFA- Tests zu falsch positiven Ergebnisse führte, woraufhin sie Kochsalz als Verdünnungsmittel verwendeten. Allerdings nutzten sie Blut als Probenmaterial um bestimmte fettsäurebindende Proteine nachzuweisen. Da Blut eine andere Zusammensetzung aufweist, als die in dieser Arbeit eingesetzten Proben, kann der Einfluss des Verdünnungsmittels völlig unterschiedlich sein. Daher sollte man in weiterführenden Arbeiten diesen Punkt als Fehlerursache ausschließen und auch andere Diluenten vergleichend verwenden (Ren et al., 2021). Die Ursache für die generell unterschiedlichen Ergebnisse bei den aktiven MP12- Versuchen sowie den Negativkontrollen bei NP, können auch in der Komplexizität der Streifen liegen. Da jeder einzelne Streifen von Hand hergestellt wurde und aus vielen verschiedenen Komponenten besteht, könnten kleine Abweichungen zu verschiedenen Ergebnissen führen. Eine Möglichkeit, diese Fehlerursache zu verhindern wäre, die Streifen, sowie auch die Antikörper- Lösungen maschinell zu fertigen, um Abweichungen zu minimieren. Auch die Herstellung der Goldkonjugate ist sehr komplex und abhängig von der Größe der Goldpartikel und der Menge und Konzentration der verwendeten Antikörper. Safenkova et al. fanden 2010 in ihrer Studie heraus, dass eine starke Abhängigkeit zwischen der Größe der Gold- Nanopartikel und der Affinität des entstehenden Goldkonjugates besteht, abhängig von den verwendeten Antikörpern (Safenkova et al., 2010). Da in dieser Arbeit nur kolloidales Gold mit einem bestimmten Durchmesser verwendet wurde, sollte in zukünftigen Versuchen analysiert werden, bei welcher Partikelgröße des Goldes die bestmögliche Affinität der Antikörper- Konjugate unter Berücksichtigung der Spezifität erzielt werden kann.

Die Virusanzucht und Aufkonzentrierung führte zu konzentrierteren ZKÜ von MP12 und Klon 13, was zu deutlichen Banden im LFA hätte führen können. Allerdings war es zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich funktionierende Streifen herzustellen, da die Antikörper über die Zeit denaturiert sind und nicht mehr einsatzbereit waren. Das zeigte sich daran, dass alle nach der Virusanzucht hergestellten Streifen kaum noch zu sichtbaren Banden führten. Auch die Kontrollbanden waren sehr schwach zu sehen, sodass mit diesen Streifen keine Aussage mehr getroffen werden konnte. Da die Herstellung neuer monoklonaler Antikörper sehr zeitaufwendig ist, war dies im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Weiterführende Arbeiten sollten die aufkonzentrierten ZKÜ nochmals mittels LFA testen, bei welchen dann neue Antikörper eingesetzt werden können.

In der Arbeit von Sossah et al. 2019 wurde ebenfalls ein NP- basierter LFA zum Nachweis des RVFV hergestellt. In der Studie wurde das NP- Protein, sowie spezifische monoklonale Antikörper hergestellt und verwendet. Auch hier erfolgte die Kopplung des einen Antikörpers

an kolloidales Gold. Die Antikörper für die Test- und Kontrolllinie wurden hier mit einer Bio-Dot- Airbrush- Ausrüstung aufgetragen, was zu deutlich klareren Linien führt als in dieser Arbeit, bei der die Linien per Hand mit der Pipette aufgetragen wurden. Die restliche Durchführung von Sossah et al. ist der in dieser Arbeit sehr ähnlich, jedoch wurden andere Materialien für die Streifen, sowie andere Reagenzien für die Lösungen verwendet. Die Sensitivität der Streifen wurde mit 100 % angegeben, da alle positiven Proben auch von den Referenzmethoden als positiv detektiert wurden, die Spezifität mit 98,88 %, da es auch in dieser Studie zu falsch positiven Ergebnissen kam (Sossah et al., 2019).

Domfe et al. führten 2022 eine Studie durch, bei der sie ebenfalls einen RVFV LFA herstellten, mit dem jedoch nicht Antigene, sondern RVFV- spezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Die Bindung erfolgte dabei an das *Staphylococcus*- Protein A (ProA), das sowohl als Immobilisierungsreagenz für die Kontrolllinie, als auch als Konjugat verwendet wurde, um den Gebrauch von spezifischen Antikörpern zu umgehen. Da das ProA eine sehr hohe Affinität gegenüber IgG- Antikörpern aufweist, kann es diese an der Testlinie einfangen und fixieren. Zur Erstellung der Testlinie diente hier das NP- Protein. Die Kontrolllinie, sowie das mit Gold konjugierte Nachweisreagenz, bestand aus ProA. Die hergestellten Streifen dieser Studie konnten erfolgreich eingesetzt werden, wobei eine Nachweisgrenze von 0,125 mg/ ml RVFV- Antikörper berechnet wurde. Auch diese Art LFA birgt großes Potential, gerade weil die aufwendige Herstellung monoklonaler Antikörper umgangen werden kann (Domfe et al., 2022).

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit hergestellten LFA- Teststreifen vielversprechende Ergebnisse lieferten und prinzipiell erfolgreich waren. Jedoch müssen in zukünftigen Versuchen die zahlreichen Einflüsse sämtlicher Parameter auf das Ergebnis untersucht werden. Dies beinhaltet den Einsatz unterschiedlicher Materialien der einzelnen LFA- Komponenten beziehungsweise deren Vorbehandlung und deren mögliche Wechselwirkungen. Des Weiteren kann untersucht werden, welche Partikelgröße der kolloidalen Goldlösung optimal zu den monoklonalen Antikörpern passt. Dies ist einer der wichtigsten Parameter für den optimierten LFA, da die Herstellung des Goldkonjugates sehr komplex ist und kleine Unterschiede der Zusammensetzung das Ergebnis stark beeinflussen. Dies ist besonders wichtig hinsichtlich der Spezifität des LFA. Falsch positive Ergebnisse, die gerade bei dem NP- basierten LFA gesehen wurden, sollten durch weitere Optimierungen reduziert werden. Für den Gn- basierten LFA müssen weitere Arbeiten dessen Sensitivität erhöhen.

Da die Antikörper für die Versuche mit den aufkonzentrierten Virusstämmen nicht mehr

geeignet waren, dieser Ansatz jedoch vielversprechend war, wäre eine weitere Möglichkeit für zukünftige Tests, die monoklonalen Antikörper neu herzustellen und aufzureinigen und anschließend die LFA- Tests mit diesen zu wiederholen.

Insgesamt besitzen die LFA ein großes Potential und sind- wenn optimal eingestellt- eine schnelle und einfache Methode, das RVFV vor Ort und ohne Laborausrüstung oder Vorkenntnisse nachzuweisen. Dies wäre gerade in Ländern von großem Vorteil, die die klassischen Möglichkeiten der Virusdiagnostik nicht besitzen, um Krankheitsfälle schnell zu identifizieren und dadurch eine Ausbreitung durch Vorbeugungsmaßnahmen zu verhindern.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Lateral- Flow- Assays zur Detektion des Rifttafiebervirus hergestellt und etabliert. Dazu wurden Antigen- Antikörper- Bindungen untersucht, welche zum Einen auf dem Nukleokapsidprotein NP und zum Anderen auf dem Glykoprotein Gn beruhten. Dabei konnte mittels Sandwich- ELISA gezeigt werden, dass die monoklonalen Antikörper Gn 32/ Gn 168 spezifisch das Gn- Antigen und die NP 107/ NP 9 spezifisch das NP- Antigen binden können. Für die Herstellung der LFA wurde ein detailliertes Protokoll etabliert, wobei die primären „capture“ Antikörper Gn 32 und NP 107 in einer Konzentration von 10 mg/ ml als Testlinie aufgetragen wurden. Für die Kontrolllinie wurde ein Goat Anti- Mouse- IgG Antikörper eingesetzt, welcher die Funktionalität des Streifens nachweist. Die sekundären „detection“ Antikörper Gn 168 und NP 9 wurden mit kolloidalem Gold konjugiert, welches als Färbemittel der Sichtbarmachung der Kopplung dient. Als Probe dienten die entsprechenden Antigene Gn und NP, die als rekombinante Proteine in verschiedenen Konzentrationen vorlagen, sowie die inaktiven und aktiven Virusstämme MP12 und Klon 13 aus Zellkulturüberständen. Die Versuche mit den Antigenen als Probe waren erfolgreich und lieferten eindeutige gut sichtbare Banden, wobei der Gn- LFA eine höhere Sensitivität im Vergleich zum NP- LFA aufwies. Auch die zwei Virusstämme MP12 und Klon 13 konnten mit beiden LFA erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass durch die vorherige Virus- Inaktivierung eine insgesamt bessere Nachweisbarkeit erreicht wurde. Bei den Versuchen mit den Virusstämmen zeigte der NP- LFA insgesamt eine höhere Sensitivität, wies jedoch im Vergleich zu dem Gn- LFA eine geringere Spezifität auf. Der inaktivierte Vakzine- Stamm MP12 wurde von beiden LFA richtig positiv detektiert, während das aktive unbehandelte MP12 bei beiden Teststreifen zu schlechteren Ergebnissen führte und von dem Gn- basierten LFA nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Der Grund dafür könnte sein, dass bei der Inaktivierung durch die Zerstörung der Virusstruktur und Modifikation viraler Proteine die Bindestellen (Epitope) des Antigens für die Antikörper frei werden und es so besser detektierbar ist. Klon 13 wurde in beiden LFA richtig detektiert, jedoch mit schwachen Signalen auf der Testlinie. In weiterführenden Arbeiten müssen die einzelnen Materialien und Herstellungsschritte optimiert werden, um einen erfolgreichen und routinemäßigen Einsatz im Feld zu ermöglichen. Eine Zusammenarbeit mit einem kommerziellen Anbieter wäre dabei sinnvoll.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien	13
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	14
Tabelle 3: Konzentrationen der Gn- Antikörper nach Dialyse	17
Tabelle 4: Konzentrationen der NP- Antikörper nach Dialyse	18
Tabelle 5: Pipettierschema für den PCR- Mastermix.....	28
Tabelle 6: PCR- Cycler- Programm	28
Tabelle 7: CT- Werte der PCR	29
Tabelle 8: Kopienzahlen der Proben	31
Tabelle 9: LFA- Ergebnisse der einzelnen Versuche	44
Abbildung 1: Schema eines Sandwich- ELISA (Molecular Devices, 2023)	11
Abbildung 2: Schema eines Lateral- Flow- Assays (Koczula, Gallotta, 2016)	12
Abbildung 3: Gefriergetrockneter Antikörper.....	22
Abbildung 4: Negativkontrolle Zellzucht Tag 4	25
Abbildung 5: MP12- Zellen Tag 4	25
Abbildung 6: Klon 13 Zellen Tag 4	26
Abbildung 7: Amplifikationskurven PCR.....	30
Abbildung 8: Standardkurve RVFV Standards	31
Abbildung 9: Gn- basierter ELISA	33
Abbildung 10: graphische Darstellung Gn- ELISA	33
Abbildung 11: NP- basierter ELISA	35

Abbildung 12: graphische Darstellung NP- ELISA	35
Abbildung 13: ELISA mit inaktiviertem MP12	36
Abbildung 14: graphische Darstellung ELISA mit inaktiviertem MP12	37
Abbildung 15: graphische Darstellung ELISA mit aktivem MP12	37
Abbildung 16: Gn- LFA, Probe Antigen 1/ 10.....	38
Abbildung 17: NP- LFA, Probe Antigen 1/ 10	38
Abbildung 18: Gn- Antigenverdünnungsreihe	39
Abbildung 19: NP- Antigenverdünnungsreihe.....	40
Abbildung 20: Gn- LFA MP12 inaktiv	41
Abbildung 21: NP- LFA MP12 inaktiv.....	41
Abbildung 22: Gn- LFA MP12 aktiv	42
Abbildung 23: NP- LFA MP12 aktiv	42
Abbildung 24: Gn- LFA Klon 13	43
Abbildung 25: NP- LFA Klon 13.....	43
Abbildung 26: NP Medium und Positivkontrolle	44

8 Literaturverzeichnis

Bird, B.H.; Khristova, M.L.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Nichol, S.T.: Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J Virol.* 2007. doi: 10.1128/JVI.02095-06. Epub 2006 Dec 27. PMID: 17192303; PMCID: PMC1865992

Bird, B.H.; Ksiazek, T.G.; Nichol, S.T.; Maclachlan, N.J.: Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc.* 2009. doi: 10.2460/javma.234.7.883. PMID: 19335238

Bormann, T.: Entwicklung eines immunchemischen Schnelltestverfahrens zum Nachweis des Rifttalfiebervirus. Masterarbeit. Neubrandenburg. 2018. Verfügbar unter: https://digibib.hsnb.de/file/dbhsnb_thesis_0000001825/dbhsnb_derivate_0000002564/Masterarbeit-Bormann-2018.pdf. letzter Zugriff: 26.04.2023

Cêtre-Sossah, C.; Pédarrieu, A.; Juremalm, M.; Jansen, Van Vuren, P.; Brun, A.; Ould, El Mamy, A.B.; Héraud, J.M.; Filippone, C.; Ravalohery, J.P.; Chaabihi, H.; Albina, E.; Dommergues, L.; Paweska. J.; Cardinale, E.: Development and validation of a pen side test for Rift Valley fever. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019. doi: 10.1371/journal.pntd.0007700. PMID: 31509527; PMCID: PMC6738586

Choi, D.H.; Lee, S.K.; Oh, Y.K.; Bae, B.W.; Lee, S.D.; Kim, S.; Shin, Y.B.; Kim, M.G.: A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I. *Biosens Bioelectron.* 2010. doi: 10.1016/j.bios.2010.01.019. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20167468

Chotithammakul, S.; Cortie, M.B.; Pissuwan, D.: Comparison of Single- and Mixed-Sized Gold Nanoparticles on Lateral Flow Assay for Albumin Detection. *Biosensors (Basel).* 2021. doi: 10.3390/bios11070209. PMID: 34206883; PMCID: PMC8301757

Domfe, T.; Njengele-Tetyana, Z.; Mhlanga, N.; Tetyana, P.; Skepu, A.; Ngila, J.C.; Sikhwivhilu, L.M.: Development of a Versatile Half-Strip Lateral Flow Assay toward the Detection of Rift Valley Fever Virus Antibodies. *Diagnostics (Basel).* 2022. doi: 10.3390/diagnostics12112664. PMID: 36359507; PMCID: PMC9689200

Dungu, B.; Lubisi, B.A.; Ikegami, T.: Rift Valley fever vaccines: current and future needs. *Curr Opin Virol.* 2018. doi: 10.1016/j.coviro.2018.02.001. Epub 2018 Mar 4. PMID: 29514112

Fahlandt, H.: Entwicklung eines Lateral Flow Assays zum Nachweis von Salmonellen auf Grundlage von Antikörpern gegen Peptide des Effektorproteins SipC des Typ III Sekretionssystems von *Salmonella* spp. Dissertation. Rostock. 2016. Verfügbar unter: https://rosdok.uni-rostock.de/file/rosdok_disshab_0000001568/rosdok_derivate_0000034726/Dissertation_Fahlandt_2016.pdf. letzter Zugriff: 26.04.2023

Fafetine, J.M.; Tijhaar, E.; Paweska, J.T.; Neves, L.C.; Hendriks, J.; Swanepoel, R.; Coetzer, J.A.; Egberink, H.F.; Rutten, V.P.: Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of a N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants. *Vet Microbiol.* 2007. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.11.008. Epub 2006 Nov 21. PMID: 17187944

Hartman, A.: Rift Valley Fever. *Clin Lab Med.* 2017. doi: 10.1016/j.cll.2017.01.004. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28457351; PMCID: PMC5458783

Jäckel, S.; Eiden, M.; Dauber, M.; Balkema-Buschmann, A.; Brun, A.; Groschup, M.H.: Generation and application of monoclonal antibodies against Rift Valley fever virus nucleocapsid protein NP and glycoproteins Gn and Gc. *Arch Virol.* 2014. doi: 10.1007/s00705-013-1867-4. Epub 2013 Oct 8. PMID: 24100475

Kiesslich, S.; Kamen, A.A.: Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnol Adv.* 2020. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107608. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32768520; PMCID: PMC7405825

Koczula, K.M.; Gallotta, A.: Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 2016. doi: 10.1042/EBC20150012. PMID: 27365041; PMCID: PMC4986465

Kohl, A.; Hart, T.J.; Noonan, C.; Royall, E.; Roberts, L.O.; Elliott, R.M.: A bunyamwera virus minireplicon system in mosquito cells. *J Virol.* 2004. doi: 10.1128/JVI.78.11.5679-5685.2004. PMID: 15140965; PMCID: PMC415823

Mansfield, K.L.; Folly, A.J.; Hernández-Triana, L.M.; Sewgobind, S.; Johnson, N.: Batai Orthobunyavirus: An Emerging Mosquito-Borne Virus in Europe. *Viruses*. 2022 Aug. doi: 10.3390/v14091868. PMID: 36146674; PMCID: PMC9503884

Molecular Devices: Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA). 2023. Verfügbar unter: <https://de.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>. Letzter Zugriff: 20.05.2023

Pepin, M.; Bouloy, M.; Bird, B.H.; Kemp, A.; Paweska, J.: Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res*. 2010. doi: 10.1051/vetres/2010033. PMID: 21188836; PMCID: PMC2896810

Petrova, V.; Kristiansen, P.; Norheim, G.; Yimer, S.A.: Rift valley fever: diagnostic challenges and investment needs for vaccine development. *BMJ Glob Health*. 2020. doi: 10.1136/bmjgh-2020-002694. PMID: 32816810; PMCID: PMC7437696

Ren, Y.G.; Liu, M.C.; Ji, M.Z.; Chen, C.; Hu, H.Z.; Wang, Z.X.; Yu, P.Q.; Shang, J.M.; Zhou, Q.W.; Tao, N.Y.; Guo, Y.F.; Lu, Y.J.; Wang, Z.Z.: Rapid detection of human heart-type fatty acid-binding protein in human plasma and blood using a colloidal gold-based lateral flow immunoassay. *Exp Ther Med*. 2021. doi: 10.3892/etm.2021.10673. Epub 2021 Aug 31. PMID: 34539834; PMCID: PMC8438696

Safenkova, I.V.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B.: Correlation between the composition of multivalent antibody conjugates with colloidal gold nanoparticles and their affinity. *J Immunol Methods*. 2010. doi: 10.1016/j.jim.2010.03.010. Epub 2010 Mar 27. PMID: 20347832

Thermo Fisher Scientific: Application Note- Real- Time PCR: Understanding C_T. Applied biosystems. 2016. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>. Letzter Zugriff: 05.05.2023

Wang, S.; Zhang, C.; Zhang, Y.: Lateral flow colloidal gold-based immunoassay for pesticide. *Methods Mol Biol*. 2009. doi: 10.1007/978-1-60327-569-9_15. PMID: 19159101

Wright, D.; Kortekaas, J.; Bowden, T.A.; Warimwe, G.M.: Rift Valley fever: biology and epidemiology. *J Gen Virol.* 2019. doi: 10.1099/jgv.0.001296. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31310198; PMCID: PMC7613496

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind durch Zitate als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene digitale Version mit der eingereichten schriftlichen Arbeit übereinstimmt.

Ort, Datum

Eigenhändige Unterschrift