

6. Zusammenfassung

Blum, Birgitta Barbara Elisabeth: Genuspezifischer Nachweis von Alphaviren mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen konservierte Epitope.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein genusspezifischer *Antigen-Capture-Test* entwickelt, der in der Lage ist, 23 Alphavirusstämme aus allen antigenen Komplexen in einem Testansatz empfindlich nachzuweisen.

Er basiert auf einem von GREISER-WILKE et al. (1991) [38] etablierten *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), der eine breite Kreuzreaktivität aufwies, einige Virusstämme jedoch nur mit einer geringen Empfindlichkeit erkannte und daher zu einer starken Streuung beim Nachweis verschiedener Alphaviren führte. Die Empfindlichkeit des *Antigen-Capture-Tests* konnte dadurch erhöht und die Testgesamtdauer verkürzt werden, daß als Fangantikörper die breit kreuzreagierenden und hochaffinen monoklonalen Antikörper SL-K42 bzw. EEE 1A eingesetzt wurden. Beide waren gegen konservierte Epitope auf dem E1-Glykoprotein gerichtet, die bei allen Alphaviren sowohl auf zellgebundenem Virus als auch auf reifen Virionen exprimiert werden. Damit war ein einziger monoklonaler Antikörper in der Lage, alle Alphaviren zu binden.

Zusätzlich ließ sich eine Sensitivitätssteigerung dadurch erzielen, daß der Antikörper-Antigen-Komplex nach der Inkubation des Probenmaterials mit Formaldehyd fixiert wurde.

Zum Nachweis des so gebundenen Alphavirusantigens wurden die Peroxidasekonjugate des E1-spezifischen monoklonalen Antikörpers SFV/C3 und des nukleokapsidspezifischen monoklonalen Antikörpers SFV/C12 verwendet.

Gegenüber dem von GREISER-WILKE et al. (1991) [38] etablierten Test ließen sich die Nachweisgrenzen um bis zu $10^{3.0}$ 50% kulturinfektiöse Dosis pro *ml*

($KID_{50} ml^{-1}$) erniedrigen. Sie lagen im Bereich von $10^{3.2} KID_{50} ml^{-1}$ beim Getah (GET) sowie Barmah Forest Virus (BFV) und $10^{5.9} KID_{50} ml^{-1}$ beim *Eastern Equine Encephalitis Virus* (EEE) und zeigten somit eine höhere Gleichmäßigkeit im Nachweis verschiedener Alphavirusstämme.

Mit dem so modifizierten Test konnte Alphavirusantigen im Blut mit Sindbis Virus (SIN) infizierter, virämischer Mäuse nachgewiesen werden.

Damit steht ein genusspezifischer Test zum Nachweis von Alphaviren zur Verfügung, der aufgrund seiner kurzen Gesamtdauer und hohen Empfindlichkeit als schneller *Screening-Test* zur Alphavirusdiagnostik in infizierten Patienten dienen könnte. Eine weitere, einfach durchzuführende und damit praxisrelevante Anwendung ist der Einsatz des Tests bei der Vektorkontrolle zur Untersuchung von Moskitos oder Vertebratenwirten in endemischen Alphavirusgebieten, wobei vor jeder Anwendung kritisch zu prüfen ist, welche Nachweisempfindlichkeit gefordert ist und in wie weit der Test diese erreicht.

7. Summary

Blum, Birgitta Barbara Elisabeth: Genus-specific detection of Alphaviruses using cross-reactive monoclonal antibodies directed against conserved epitopes.

This study describes the development of a genus-specific antigen-capture test for the sensitive detection of 23 alphaviruses comprising all known serologic complexes. The test is based on an antigen capture enzyme immunoassay described by GREISER-WILKE et al. (1991). Also the latter test was broadly cross-reactive, but some antigens showed poor reactivity and the different alphavirus antigens were detected with a wide range of sensitivities.

The sensitivity of the test was increased and the incubation time were reduced by using the broad cross-reacting and high affine monoclonal antibody (mab) SL-K42 or EEE 1A as capture-antibody, respectively. Both mabs were directed against epitopes on the E1-Glykoprotein, which were expressed on cell-bound as well as on mature virions.

An additional increase of sensitivity of the test was achieved by formaldehydfixation of the antibody-antigen-complex after incubation of the samples.

Bound antigen was detected by using a combination of the peroxidase conjugated E1-specific mab SFV/C3 and the nucleocapsidspecific mab SFV/C12. The detection limits were reduced down to $10^{3.0}$ 50% tissue culture infective doses/ml ($TCID_{50} ml^{-1}$). The sensitivity of the test ranged from $10^{3.2}TCID_{50} ml^{-1}$ for Getah (GET) and Barmah Forest virus (BFV) and $10^{5.9}TCID_{50} ml^{-1}$ for eastern equine encephalitis virus (EEE).

The test detected Sindbis virus (SIN) antigen in the blood of infected mice. A rapid and sensitive test is now available, which could be used for screening alpha-

virus antigen in samples of infected patients.

A further possible application is the vector control in the examination of mosquitoes or vertebrate hosts in regions with endemic alphavirus-infections. Before application of the test, the sensitivity requirements for each use have to be critically determined.