

# **Diversität und Abundanz Moskito-übertragener Viren in Ghana, Westafrika**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Hanna Lisa Heidemann**

aus Essen

2020

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Drosten
2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Rockstroh

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.11.2019

Aus dem Institut für Virologie  
Direktor: Prof. Dr. C. Drosten

Für meine Familie



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>15</b>
1.1 Zoonosen und <i>Emerging Infectious Diseases</i>	15
1.2 Mosquito-übertragene Viren	17
1.2.1 Arboviren	17
1.2.2 Alphaviren	19
1.2.3 <i>Flaviviridae</i>	20
1.2.3.1 Flavivirus	20
1.2.3.2 Pegivirus	22
1.2.3.3 Hepacivirus	24
1.2.4 <i>Bunyavirales</i>	25
1.2.5 <i>Mesoniviridae</i>	28
1.3 Beschriebene mosquitoübertragene Viren und deren Vektoren in Westafrika mit Fokus auf Ghana	28
1.3.1 Gelbfiebervirus	29
1.3.2 Dengue Virus	29
1.3.3 West-Nil-Virus	31
1.3.4 Rift-Tal-Fieber-Virus	31
1.3.5 Arbovirus Immunstatus	32
1.3.6 Moskitovorkommen	33
1.4 Gegenstand der Forschung	33
1.4.1 Kumasi in Ghana, Afrika	33
1.4.2 Botanischer Garten, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, KNUST	34
1.5 Zielsetzung der Arbeit	35
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>36</b>
2.1 Material	36
2.1.1 Chemikalien	36

2.1.2	Lösungen und Puffer	36
2.1.2.1	PCR Puffer	37
2.1.2.2	Zellkulturmedien und Zusätze	37
2.1.2.3	Nährmedien für One Shot® TOP10 Chemically Competent E.coli	38
2.1.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.1.3	Kits	38
2.1.4	Enzyme	39
2.1.5	Bakterienstämme und Plasmide	39
2.1.6	Zelllinien	39
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	39
2.1.8	Technische Geräte	40
2.2	Methoden	44
2.2.1	Sammeln der Moskitos	44
2.2.1.1	Botanischer Garten, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, KNUST	44
2.2.1.2	Moskitofallen	45
2.2.2	Ökologische Analysen	47
2.2.2.1	Bildung von Fangeinheiten (FE)	47
2.2.2.2	Bestimmung der Diversität	47
2.2.3	Bestimmung der Moskitos	48
2.2.4	Herstellung der Pools	49
2.2.5	Virusanzucht	49
2.2.5.1	Kultivierung von Zellen	49
2.2.5.2	Infektionsversuche	50
2.2.5.3	Virusernte	51
2.2.6	Ultrazentrifugation	51
2.2.7	RNA Extraktion aus den Mosquito-Pools und infektiösem Zellkulturüberstand	52
2.2.8	cDNA Synthese	52
2.2.9	Polymerasekettenreaktion	54
2.2.9.1	Konventionelle PCR	54
2.2.9.2	<i>Nested</i> PCR und <i>seminested</i> PCR	54
2.2.9.3	<i>Touch Down</i> PCR	55

2.2.9.4	Generische PCR	56
2.2.9.5	<i>Real Time</i> PCR (TaqMan™)	57
2.2.9.6	Design sequenzspezifischer Primer	58
2.2.10	Agarose Gelelektrophorese	61
2.2.11	Aufreinigung von DNA	62
2.2.11.1	Aufreinigung von PCR-Produkten	62
2.2.11.2	Aufreinigung von DNA aus Agarose Gelen	63
2.2.12	Klonierung	63
2.2.13	DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse	65
2.2.14	Phylogenetische Analysen	66
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>67</b>
3.1	Moskitoabundanz auf dem Campusgelände in Kumasi, Ghana	67
3.2	PCR Screening der gepoolten Moskitos	72
3.2.1	Untersuchung auf Pegiviren	72
3.2.2	Untersuchung auf Alphaviren und Mesoniviren	73
3.2.3	Untersuchung auf Flaviviren	73
3.2.4	Untersuchung auf Bunyaviren	77
3.2.4.1	Screening auf Phenuiviren	77
3.2.4.2	Screening auf Orthobunya- und Herbeviren	86
3.3	Virusanzucht in Zellkultur	90
3.3.1	PCR Screening der CPE positiven Zellkulturüberstände	92
3.3.1.1	Untersuchung auf GB-, Alpha-, Ortho-, Phlebo- und Mesoniviren	92
3.3.1.2	Untersuchung auf Flaviviren	93
3.3.2	Exkurs: Isolierung von Viren aus einzelnen Moskitos	94
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
4.1	Virusprävalenz und Variabilität auf dem Campusgelände der Universität	96
4.1.1	Moskitoprävalenz und -diversität	96
4.1.2	Lockmittel	101
4.2	PCR Screening auf Pegiviren	103
4.3	Detektion neuer Flaviviren in Moskitos und Zellkultur	104

4.4	Versuche zu Bunyaviren	108
4.4.1	Nachweis von Herbert Virus in Ghana	108
4.4.2	Detektion zweier neuer insektenspezifischer Viren aus der Familie <i>Phenuiviridae</i> aus Ghana	109
4.5	Anzuchtversuche von Viren aus Moskitos in der Zellkultur	111
4.6	Ausblick	112
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>138</b>

## Abkürzungsverzeichnis

(g)	gasförmig
*	lebend
~	ungefähr
®	<i>Registered Trade Mark</i>
†	tot
2nd	second
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AeFV	<i>Aedes Flavivirus</i>
afrikan.	afrikanisch
AG	Aktiengesellschaft
aqua bidest.	aqua bidestillata (bidestilliertes Wasser)
Arbovirus	<i>arthropod-borne virus</i>
BG	Botanischer Garten
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BUNV	Bunyamwera Virus
BVDV	Bovine Virusdiarrhoe-Virus
bzw.	beziehungsweise
CAVV	Cavally Virus
CCHV	Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	complementary DNA
CFAV	Cell fusing agent Virus
CHIKV	Chikungunya Virus
clSF	classical insektenspezifische Flaviviren
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzenimeter
Co.	Companie

CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPE	Cytopathic effect
CUMV	Cumuto Virus
CxFV	Culex Flavivirus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEN	Dengue- und Dengue-Hämorrhagisches Fieber
DENV	Dengue Virus
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dISF	zweifach-Wirt assoziierte insekten-spezifische Flaviviren ( <i>dual-host affiliated</i> )
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpi	<i>days post infection</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
ECACC	European Collection of Cell Culture
EID	Emerging Infectious Diseases
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Ezyme-linked Immunosorbend Assay
EM	Elektronenmikroskop
F	forward
FE	Fangeinheit
FKS	Fötale Kälberserum
FP	Fangpunkt
g	Gramm
GBV	GB-Virus

GOLV	Gouléako Virus
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
HANV	Hantavirus
HCV	Hepatitis C Virus
HGV	Hepatitis G Virus
HF	High Fidelity
HPgV	Humanes Pegivirus
Hum.	Humidität
ISF	Insektenspezifische Flaviviren
JEV	Japanese Encephalitis Virus
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
km	Kilometer
km <sup>2</sup>	Quadratkilometer
KNUST	Kwame Nkrumah University of Science and Technology
KRV	Kamiti River Virus
kV	Kilovolt
L	large
l	Liter
L-15	Leibovitz's 15
LACV	La Crosse Virus
lat.	Lateinisch
LB	Lysogeny Broth
M	medium
MFV	Menghai Flavivirus
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
n	Anzahl
Na	Natrium

NAKV	Nakiwogo Virus
NCBI	National Centre for Biotechnology
NCR	None coding Region
nd	not determined
NDiV	Nam Dinh Virus
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
ONNV	O'nyong-nyong Virus
ORF	Open Reading Frame
P	Passage
PAN	Particle-Associated Nucleic Acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCLV	Phasi Charoen-like virus
pH	pH-Wert
PhaV	Phasi Charoen virus
PHYML	Phylogenetic inferences using Maximum Likelihood
PTV	Punta Toro Virus
PUUV	Puumala Virus
R	reverse
R6	Random-Hexamer Primer
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RKI	Robert Koch-Institut, Berlin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur/Reverse Transkriptase
RVFV	Rift Valley Fieber Virus
S	Small

SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SFNV	Sandfly Fever Naples Virus
SFV	Semliki Forest Virus
SDV	Sleeping Disease Virus
SINV	Sindbis Virus
SLE	St.-Louis-Enzephalits
SLEV	St.-Louis-Enzephalitis-Virus
SPDV	Salmon Pancreas Disease Virus
spp.	species (Arten)
SSIII	SuperScript™ III Reverse Transkriptase
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAHV	Tahyna-Virus
TM	TaqMan®
Tm	Temperature of melting
TOSV	Toscana Virus
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
™	Unregistered Trade Mark
UK	Universitätsklinikum
UKB	Universitätsklinikum Bonn
USA	United States of America
UUKV	Uukuniemi Virus
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEEV	Venezuelan equine encephalitis virus
VP	Virusprotein
WG	Wohngebiet
WHO	World Health Organization
WNF	West-Nil-Fieber
WNV	West Nil Virus

WSMV	Watermelon Silver Mottle Virus
YAOV	Yaoundé Virus
YF	Gelbfieber
YFV	Gelbfieber-Virus
ZIKV	Zika Virus
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromol

## 1. Einleitung

### 1.1 Zoonosen und *Emerging Infectious Diseases*

Als Zoonosen werden Infektionserkrankungen bezeichnet, die von Tieren auf den Menschen übertragen werden. Mögliche Erreger können Viren, Bakterien, Pilze oder Würmer sein. Neue oder genetisch veränderte Infektionserreger, bei denen sich die geografische Ausbreitung verändert hat oder bei denen eine Zunahme der Inzidenz beobachtet wurde, werden als *Emerging Infectious Diseases (EID)* bezeichnet (Racaniello 2004, Morse 1995). Zoonotische Erreger und *EIDs* kommen in verschiedenen Virusfamilien vor. Zu dieser Gruppe von Viren gehören unter anderem das Influenza A Virus aus der Familie *Orthomyxoviridae*, das SARS („severe acute respiratory syndrome“) -assoziierte Coronavirus (SARS-CoV, Familie *Coronaviridae*) oder mehrere Mitglieder der Virusfamilie *Paramyxoviridae* (Wang et al. 2013, Jones et al. 2008, Drosten et al. 2003, Chua et al. 2000). Eine große Bedeutung bei der Transmission von *EIDs* spielen hierbei Fledermäuse, da sie mit einer Vielzahl an zoonotischen Erregern infiziert sind, wie z.B. mit SARS-CoV oder Henipaviren (Calisher et al. 2006). Mögliche Ursachen der Zunahme von Zoonosen und *EIDs* können Veränderungen durch den Menschen an seiner Umwelt sein. Im Vordergrund stehen dabei die Urbanisierung, Flugverkehr und Tourismus, sowie Veränderungen von Ökosystemen (Jones et al. 2008, Gubler 1998, Aguirre und Tabor 2008, Daszak et al. 2000, Cunningham und Daszak 2000).

Das Influenza A Virus unterliegt aufgrund des genetischen *drift* (Mutationsereignisse) und *shift* (Neukombination von Genen) einem starken Potential, Pandemien in der menschlichen Bevölkerung auszulösen (Wang et al. 2013). Dies erfolgte im Jahre 2004 in Südost Asien. Bei hochpathogenen H5N1 Influenza A Viren aus Geflügel hatten sich durch genetische Mutationsereignisse und Neukombinationen (sog. Reassortments) die Oberflächenantigene (Hämagglutinin und Neuraminidase) so stark verändert, dass die Viren eine deutlich gesteigerte Pathogenität aufwiesen (Wang et al. 2013). Weiterhin ermöglichte diese Neukombination der Genomsegmente eine Infektion neuer Wirte. Das H5N1 Influenza A Virus konnte somit nicht nur Hühner, sondern auch Menschen infizieren, und löste eine Pandemie in der Bevölkerung mit einer Mortalitätsrate von mehr als 50 % aus (Webster und Govorkova 2006, Ferguson et al. 2005).

Charakteristisch sind die oft schweren klinischen Verläufe der Erkrankung mit einer fulminanten Pneumonie und einem Multiorganversagen (de Jong et al. 2006).

Wie schnell sich Pathogene z.B. über den Flugverkehr und Reisetätigkeit ausbreiten können, hat die SARS Pandemie in den Jahren 2002/2003 gezeigt. Das SARS-CoV hatte sich in nur wenigen Monaten, ausgehend von Südchina in insgesamt 26 Länder ausgebreitet. Von über 8000 infizierten Menschen starben 774 an den Folgen der Erkrankung (Peiris et al. 2003). Nach der SARS Pandemie konnten Fledermäuse als das natürliche Reservoir von Coronaviren ausgemacht werden (Hörmansdorfer 2008). In verschiedenen Hufeisennasenfledermäusen aus unterschiedlichen Regionen Chinas konnten Coronaviren nachgewiesen werden, die mit dem aus Menschen isolierten SARS-CoV eine nahe phylogenetische Verwandtschaft aufwiesen. Als mögliche Übertragungswege der Viren durch Fledermäuse kommen hierbei Faeces, Harn wie auch Blut oder Tröpfchen bzw. Aerosole aus dem Respirationstrakt in Betracht (Wang et al. 2006, Hörmansdorfer 2008).

Ein weiteres Beispiel einer *EID* sind Infektionen durch Henipaviren. Die Henipaviren aus der Familie der *Paramyxoviridae*, umfassen derzeit zwei Spezies. Der Gattungsname setzt sich aus der Bezeichnung der beiden hoch pathogenen Viren, Hendra- und Nipahvirus, zusammen. Das Hendravirus, erstmals 1994 in Flughunden in Australien gefunden, konnte durch diese auf das Pferd und dann auf den Menschen übertragen werden. Die Infektion der Pferde durch Hendraviren kann einen asymptomatischen Verlauf haben aber auch bis hin zu einer schweren respiratorischen Insuffizienz, einem Schocksyndrom und zu einem zügigen Tod innerhalb weniger Tage führen. Die Erkrankung wird wahrscheinlich durch Tröpfchen übertragen und ruft bei Menschen eine schwere Ateminsuffizienz oder Enzephalitis hervor (Weingartl et al. 2009).

1998 wurde ein Ausbruch hochfieberhafter Enzephalitiden beim Menschen mit häufiger Todesfolge in Malaysia beschrieben. Auslöser war eine Infektion mit dem Nipahvirus. Der Übertragungsweg erfolgte ausgehend von Fledermäusen der Gattung *Pteropus* über Schweine auf den Menschen. Aufgrund der räumlichen Nähe von Nutztier und Mensch zeigte sich eine rasante Ausbreitung des hochinfektiösen Virus (Hayman et al. 2008, Yob et al. 2001). Von 265 erkrankten Personen starben 105 an den Folgen der Viruserkrankung (Chua et al. 2000, Yob et al. 2001). Nachdem bisher nur Flughunde der Gattung *Pteropus* als Wirte für Henipaviren bekannt waren, konnten Henipaviren 2008

erstmalig in Flughunden der Gattung *Eidolon helvum* in Ghana nachgewiesen werden, welches gleichzeitig der erste Nachweis auf dem afrikanischen Kontinent war. (Hayman et al. 2008, Epstein et al. 2008).

## 1.2 Mosquito-übertragene Viren

### 1.2.1 Arboviren

Unter dem Begriff Arboviren (engl. *arthropod-borne viruses*) werden Viren zusammengefasst, welche die Fähigkeit besitzen, sowohl in Vertebraten, wie Vögeln, Amphibien oder Säugetieren, als auch in haematophagen Arthropoden einen produktiven Infektionszyklus zu durchlaufen. Arthropoden wie Moskitos, Zecken, Sandmücken, Gnizen oder Wanzen dienen dabei als Übertragungsvektor. Arthropoden infizieren sich beim Saugakt an infizierten Vertebraten. Die Erreger vermehren sich in den Arthropoden zuerst im Verdauungstrakt und breiten sich dann im gesamten Organismus aus. Durch den Befall der Speicheldrüsen kann bei nachfolgenden Blutmahlzeiten das Virus auf weitere Wirte übertragen werden (Meyer 2007). Der Mensch stellt in diesem Transmissionszyklus häufig einen Endwirt dar und Moskitos können sich nicht erneut infizieren. Ausnahmen bilden hier das Gelbfieberevirus, Dengue Virus oder Chikungunyavirus. In den Vertebraten breiten sich die Viren zunächst lokal an der Einstichstelle in den Epithel-, bzw. dendritischen Zellen aus. Anschließend erfolgt eine systemische Ausbreitung (Modrow et al. 2010). Meist verläuft eine arbovirale Infektion asymptomatisch. Es können jedoch auch unspezifische Symptome wie hohes Fieber, ein Exanthem oder Muskel- und Gelenkschmerzen auftreten. Neben der fieberhaft-grippalen Symptomatik können die Viren jedoch auch Enzephalitiden oder bei einer Infektion der Leberzellen eine Hepatitis auslösen. Zu den Erregern, welche eine Enzephalitis auslösen können, zählen beispielsweise die Flaviviren West Nil Virus (WNV) oder St. Louis Enzephalitis Virus (SLEV) (Kramer et al. 2007, Reisen 2003). Arboviren, die vorwiegend die Leber infizieren und eine Hepatitis auslösen können, sind u. a. das *Rift Valley Fever Virus* (RVFV) oder das Gelbfieber Virus (YFV) (Gubler 2002, Modrow et al. 2010).

Dengue- und Dengue-Hämorrhagisches Fieber (DEN), Gelbfieber (YF), Japanische-Enzephalitis (JE), St.-Louis-Enzephalitis (SLE), sowie West-Nil-Fieber (WNF) sind einige

der wichtigsten durch Arboviren verursachten Krankheiten. Dengue-Fieber, als Mosquito-übertragene Erkrankung, ist nach Malaria die wichtigste tropische Infektionserkrankung mit geschätzten 100 Millionen Fällen von Dengue-Fieber, 500.000 Fällen von Dengue-Hämorrhagischem Fieber und ca. 12.500 Todesfällen pro Jahr weltweit (WHO 2019). Es sind vier Dengue-Serotypen bekannt, die in nahezu allen tropischen Regionen verbreitet sind (Guzman und Harris 2015). Bislang ist kein Impfstoff gegen das Dengue-Virus bekannt.

Trotz des Vorhandenseins eines effektiven Impfstoffs, ist Gelbfieber in Afrika noch immer ein großes Gesundheitsproblem. Laut WHO (WHO 2016) sind 47 afrikanische Länder endemisch für Gelbfieber. Weltweit kommt es jährlich zu ca. 200.000 Gelbfieberinfektionen mit ca. 30.000 Todesfällen. Obwohl seit fast 70 Jahren ein effektiver Impfstoff zur Verfügung steht und in einigen afrikanischen Ländern die Impfung in das Impfprogramm für Kinder aufgenommen wurde, ist die Impfbedeckung hier nicht optimal (Barnett 2007).

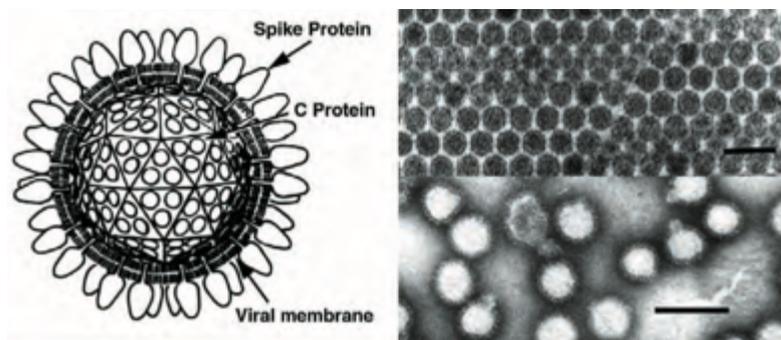
Arboviren sind in unterschiedlichen Virusfamilien zu finden, wie z.B. *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Nairoviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* und *Togaviridae*. Arboviren kommen weltweit vor, jedoch gibt es eine Häufung in den tropischen- und subtropischen Regionen der Welt. Die Moskitos sind als Überträger von besonderer Bedeutung, da sie ebenfalls weltweit und mit hoher Prävalenz in den Tropen und Subtropen vorkommen. Sie können sich sehr gut anpassen und sind durch ihre Flugfähigkeit sehr mobil. Weiterhin können sie kleinste Wasseransammlungen als Brutstätten nutzen. Gerade bei warmen Temperaturen und Überschwemmungen kann es dadurch schnell zu großen Massen an Moskitos kommen, was die Ausbreitung von viralen Erkrankungen begünstigen kann.

Von medizinischer Bedeutung sind vor allem Moskitos der Genera *Aedes*, *Anopheles* und *Culex*. Viele Moskitos besitzen einen Wirtstropismus, bevorzugen also einen bestimmten Wirt für ihre Blutmahlzeit. Diese Wirtsspezifität wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, wie beispielsweise die Verfügbarkeit/Häufigkeit des Wirts aber auch welchen Geruch der Wirt aussendet (Zwiebel und Takken 2004). Moskitos des Genus *Culex* bevorzugen neben Vögeln auch Säugetiere als Wirte. Besonders Moskitos des Genus *Culex* sind bekannte Vektoren für diverse Arboviren. Diese weltweit

vorkommenden Moskitos sind z. B. Überträger des WNV, sowie von RVFV (Harbach 2011, Farajollahi et al. 2011). Moskitos des Genus *Anopheles* saugen hauptsächlich an Säugetieren (Lyima und Ferguson 2009). *Anopheles gambiae* Moskitos sind als Hauptüberträger des O'nyong-nyong Virus (ONNV) beschrieben (White 1974). Die Infektion zeichnet sich durch hohes Fieber mit Schüttelfrost, Kopfschmerzen und Lymphadenitis aus. Vertreter des Genus *Aedes* sind Hauptüberträger wichtiger humanpathogener Viren. *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* übertragen bsw. YFV, Dengue Virus (DENV), Chikungunya Virus (CHIKV) und Zika Virus (ZIKV) (Diallo et al. 2005, Barrett und Monath 2003, Panning et al. 2008, Martha et al. 2014)

### 1.2.2 Alphaviren

Viren des Genus *Alphavirus* zählen zusammen mit den Rubiviren zu der Familie *Togaviridae*. Alphaviruspartikel haben einen Durchmesser von 60 – 80 nm und bestehen aus einem ikosaedrischen Kapsid, welches von einer Membranhülle umgeben ist.



**Abb. 1:** Graphische Darstellung eines Alphaviruspartikels. Die Viruspartikel sind sphärisch geformt mit einem Durchmesser von ca. 70 nm. Sie besitzen ein ikosaedrisches Kapsid, umgeben von einer Membranhülle. Die Hülle besitzt charakteristische Spikes und Glykoproteine und umgibt die positiv-einzelsträngige RNA (Abbildung aus: *Togaviridae. Virus taxonomy; eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*).

Das Alphavirusgenom besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit Plus-Polarität und ist ca. 12 kb groß (Ryman und Klimstra 2008). Das 5'-Ende trägt die Informationen für vier Nichtstrukturproteine, die vom Genom translatiert und anschließend proteolytisch gespalten werden. Am 3'-Ende des Genoms befinden sich die Gene für das Kapsid-

Protein und die drei Membranproteine. Diese werden postreplikativ translatiert (Modrow et al. 2010).

Die „Alt-Welt“-Alphaviren beinhalten das Sindbis Virus (SINV), Semliki Forest Virus (SFV), CHIKV und das ONNV. Sie lösen vor allem fieberhafte und arthritische Krankheitsbilder aus. Beschriebene Symptome einer akuten Infektion sind Fieber mit Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Durchfall und Erbrechen sowie Arthralgien, die auch über Jahre persistieren können. Die „Neu-Welt“-Alphaviren wie das Eastern-, Western-, und Venezualan-Equine-Encephalitis Virus (EEEV, WEEV & VEEV) zeichnen sich zusätzlich zu den oben genannten Symptomen vor allem durch die encephalitischen Krankheitsverläufe bei Pferden wie auch Menschen aus (Ryman und Klimstra 2008).

Vor allem in Südamerika wird das Vorkommen von VEEV, CHIKV und SINV beschrieben. Die Übertragung dieser Viren findet durch *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* oder *Mansonia* spp. Moskitos statt (Rezza et al. 2007, Enserink 2007, Gould et al. 2010). In Afrika, im Speziellen für Ghana sind einzelne Infektionen beschrieben, aber ein größerer Ausbruch wurde bisher nicht beobachtet (Cavrini et al. 2009, Bessaud et al. 2006).

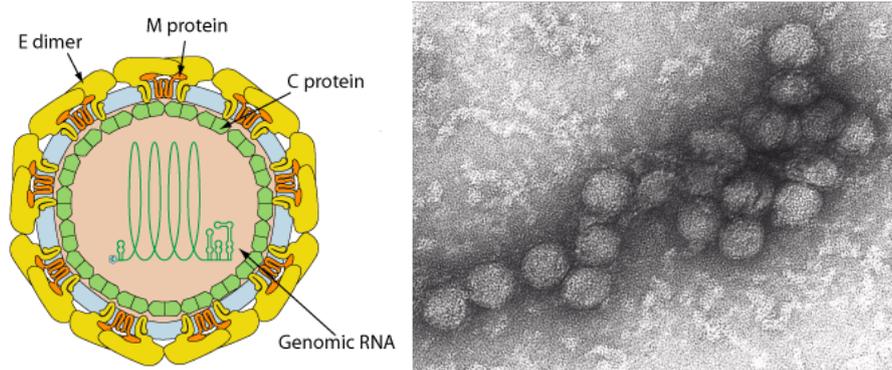
### 1.2.3 *Flaviviridae*

Die Familie *Flaviviridae* umfasst mehr als 90 Virusspezies, die in die vier Genera *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* und *Pegivirus* unterteilt sind (Abb. 2; Knipe et al. 2006). Das Genus *Flavivirus* wird im nächsten Abschnitt gesondert beschrieben, siehe 1.2.3.1. Mitglieder des Genus *Pestivirus* haben ausschließlich eine veterinärmedizinische Bedeutung (Hulst und Moormann 1997), während das Hepatitis-Virus C (HCV) als wichtigster Vertreter des Genus *Hepacivirus* eine schwerwiegende Leberinfektion des Menschen verursachen kann (Calisher und Gould 2003). Der Name *Pegivirus* setzt sich aus „pe“ von „persistent“ und dem historischen Bezug zu seinem früheren Namen „GB“ oder Hepatitis „G“ Virus zusammen, siehe 1.2.3.2 (Stapleton et al. 2011).

#### 1.2.3.1 *Flavivirus*

Innerhalb der Familie *Flaviviridae* sind Arboviren bisher für das Genus *Flavivirus* beschrieben. Die Virionen der Flaviviren sind im Durchmesser 37 – 50 nm große,

umhüllte, kubische Partikel (Abb. 2). Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA in Plus-Polarität mit einer Länge von ca. 10 kb. Die Viruspartikel bestehen aus drei Strukturproteinen, dem Kapsid-Protein, dem M-Protein und dem E-Protein. Das M-Protein und das E-Protein sind glykosilierte Membranproteine, wobei das E-Protein die Rezeptor-bindende Domäne enthält.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung eines Flaviviruspartikels. Die Viruspartikel sind kubisch geformt und haben einen Durchmesser von ca. 50 nm. Die Membranproteine sind gekennzeichnet mit M und E, das Kapsid-Protein mit C. Die Hülle umgibt eine plus gerichtete einzelsträngige RNA (Abbildung: [links] Viral Zone: Flavivirus. Accessed April 2, 2011. Expert Protein Analysis System. Rasterelektronenmikroskopisches Bild [rechts] von CDC/Cynthia Goldsmith Creation, [http://phil.cdc.gov/phil\\_images/10302002/8/PHIL\\_2290\\_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/phil_images/10302002/8/PHIL_2290_lores.jpg))

Das Genom codiert für einen offenen Leserahmen, von dem ein Vorläuferpolyprotein synthetisiert wird, welches anschließend in die viralen Strukturproteine und Nichtstrukturproteine gespalten wird. Innerhalb des Genus *Flavivirus* sind über 70 verschiedene Spezies bekannt (ICTV 2012). Bedeutende moskito-übertragene Flaviviren sind DENV, Japan Enzephalitis Virus (JEV), SLEV, WNV und YFV. Klinische Manifestationen einer Infektion mit Flaviviren sind Enzephalitiden, fieberhafte Infekte mit Schüttelfrost oder auch hämorrhagische Fiebererkrankungen, zum Teil mit Beteiligung der Leber in Form von Hepatitiden. Das bedeutendste humanpathogene Flavivirus ist YFV, welches durch *Aedes aegypti* Moskitos, auch Gelbfiebermücke oder Asiatische Tigermücke genannt, übertragen wird (Gillett 1971, Baron 1966). Nach einer Inkubationszeit von bis zu sechs Tagen, imponiert das klinische Bild, zum Teil mit einem biphasischen Verlauf, welches mit hohem Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Übelkeit sowie Erbrechen beginnt. Nach drei bis vier Tagen setzt eine Besserung der Symptome

ein. In ungünstigen Krankheitsverläufen setzt anschließend eine zweite Phase mit Fieberspitzen ein, die mit Nieren- und Leberzellschäden und mit einem Ikterus, Erbrechen und Hämorrhagien einhergehen kann. Dieser Verlauf ist durch eine hohe Mortalitätsrate von bis zu 80 % gekennzeichnet. Seit 1936 gibt es einen Impfstoff gegen YFV, der erfolgreich in Endemiegebieten verabreicht wird und die Infektionsrate mit YFV reduziert hat.

Weiterhin sind zahlreiche Flaviviren bekannt, die ausschließlich Moskitos infizieren und nicht auf Vertebraten übertragen werden, sogenannte Insekten- (ISF) oder Moskitospezifische Flaviviren (Blitvich und Firth 2015).

In den letzten Jahren zeigte sich eine rasch zunehmende Anzahl an neu beschriebenen ISF (Bolling et al. 2015), welches sich auf die Fortschritte der Sequenziertechnologien und genauen phylogenetischen Analysen zurückführen lässt. Hierauf lässt sich die aktuelle Unterteilung unter anderem in klassische ISF (engl. *classical* ISF, cISF) und sogenannte zweifach-Wirt assoziierte insektenspezifische Flaviviren (engl. *dual-host affiliated*, dISF) zurückführen. Phylogenetische Untersuchungen konnten zeigen, dass klassische insektenspezifische Flaviviren wie das z. B. *Cell fusing agent virus* (CFAV) eine eigene monophyletische Gruppe im Vergleich zu den bisher beschriebenen Flaviviren wie z.B. YFV bilden (Blitvich und Firth, 2015). Die dISF zeigen sich als Gruppe nicht monophyletisch und haben trotz eines scheinbar insektenspezifischen Phänotyps eine phylogenetische Verwandtschaft zu moskito-übertragenden Flaviviren. Hauptsächlich wurden die klassischen ISF bisher in *Culex*- und *Aedes* Moskitos gefunden (Hoshino et al. 2007, Crabtree et al. 2009). Weitere prominente Beispiele für cISF sind neben dem *Cell fusing agent virus*, Kamiti River Virus (KRV), Quang Binh Virus, Nakiwogo Virus (NAKV) sowie *Culex*-, und *Aedes* Flavivirus (CxFV, AeFV) (Stollar und Thomas 1975, Cook et al. 2009 und 2012, Crabtree et al. 2003, Crabtree et al. 2009, Cook et al. 2009, Hoshino et al. 2009).

#### 1.2.3.2 Pegivirus

Das GB-Virus wurde erstmals 1967 beschrieben. Benannt wurde es nach den Initialen eines Chirurgen, bei dem das Virus erstmals detektiert wurde, nachdem die Inokulation einer Serumprobe des Patienten in Tamarinen zu einer akuten Hepatitis führte (Deinhardt et al. 1967). 1995 wurden zwei weitere Viren, GBV-A und GBV-B, aus

Tamarinen isoliert. Beide Viren wurden bisher nicht im Menschen nachgewiesen. Die Viren bilden die Gattung *Pegivirus* in der Familie *Flaviviridae* (Simons et al. 1995b).

Kurze Zeit später konnte ein weiteres Virus in humanen Serumproben, von Patienten mit einer akuten oder chronischen Hepatitis, detektiert werden. Die niedrige Homologie zu GBV-A, GBV-B und HCV legte nahe, dass es sich um ein neues Virus im Genus *Flavivirus* handelte. Vorläufig wurde dieses GBV-C genannt (Simons et al. 1995a). Im ähnlichen Zeitraum wurde ein weiteres RNA Virus, bezeichnet als Hepatitis-G-Virus (HGV), in Plasma von Patienten mit chronischer Hepatitis nachgewiesen. Dieses wurde ebenfalls in enge Verwandtschaft zu den oben genannten Viren gesetzt (Linnen et al. 1996). Eine anschließende Analyse der Genomsequenzen von HGV und GBV-C ergab eine 96 % Identität, sodass es sich um zwei verschiedene Stämme derselben Spezies handelt, die zunächst als GBV-C/HGV bezeichnet wurden (Simons et al. 1995, Linnen et al. 1996, Kim und Fry 1997). GBV-C/HGV wurde sowohl in Menschen als auch in Affen nachgewiesen, zeigte jedoch keine auslösende Krankheitssymptomatik. Alle GB-Viren zeigen eine Verwandtschaft zu HCV wobei GBV-B in engerer Beziehung steht. Beide besitzen ein Neukleokapsidprotein welches in GBV-A und GBV-C/HGV nicht gefunden wurde (Muerhoff et al. 1995).

Im Jahr 2007 wurde in einer Screeningstudie ein zu GBV-A und GBV-C entfernt verwandtes Virus in Serumproben von Flughunden (*P. giganteus*) aus Bangladesh nachgewiesen. Das Genom des Virus zeigte 50 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu den bis dahin bekannten GB-Viren und wurde als GBV-D bezeichnet. Die infizierten Tiere schienen allesamt gesund und es zeigten sich keine Hinweise auf eine Hepatitis oder weitere Erkrankung (Epstein et al. 2010). Virale RNA des GBV-D Virus wurde in 5 % von klinisch gesunden Fledermäusen einer Kolonie in Bangladesh detektiert (Stapleton et al. 2011). Bei einer viruspositiven Fledermaus wurde GBV-D RNA im Speichel nachgewiesen, sodass sowohl eine horizontale wie auch eine zoonotische Transmission vermutet wird (Stapleton et al. 2011, Quan et al. 2013).

Lediglich das GBV-B Virus, welches sich in das Genus *Hepacivirus* einreicht, zu dem auch Hepatitis C Virus (HCV) gehört, wurde als Hepatitis auslösendes Virus identifiziert (Bukh et al. 1999, Lanford et al. 2003). GBV-B verursacht eine Hepatitis in experimentell infizierten Neuweltaffen, nicht jedoch im Menschen. Das Reservoir von GBV-B ist bislang unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass GBV-B von Nagetieren stammt

(Drexler et al. 2013). Basierend auf der phylogenetischen Beziehung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp), der Genom-Organisation, sowie den pathogenen Eigenschaften der GB-Viren, wurden diese Viren in ein neues Genus mit dem Namen *Pegivirus* eingeordnet.

Familie: *Flaviviridae*

Genus: *Flavivirus*

Spezies: Gelbfieber  
*West Nil Virus*  
*Dengue Virus*  
*Japanese Encephalitis Virus*

Genus: *Pestivirus*

Spezies: Bovine viral diarrhea Virus

Genus: *Hepacivirus*

Spezies: Hepatitis C Virus  
*GBV (GBV-B)*

Genus: *Pegivirus*

Spezies: SPgV (GBV-A)  
*HPgV (GBV-C)*  
*BPgV (GBV-D)*

**Abb. 3:** Klassifikation der GB Viren innerhalb der Familie *Flaviviridae*. GBV-B als Mitglied des Genus *Hepacivirus* zusammen mit HCV wurde in GBV umbenannt. Die Viren GBV-A, GBV-C/HGV und GBV-D bilden das Genus *Pegivirus*. GBV-A und GBV-A-ähnliche Viren sind als simiane (Affen) Pegiviren (SPgV) klassifiziert und GBV-C/HGV sind als humane Pegiviren (HPgV) eingeteilt. GBV-D wurde in bat (Fledermaus) *Pegivirus* (BPgV) umbenannt.

Die humanen Pegiviren (HPgV) sind bisher nicht mit einer Hepatitis assoziiert (Stapleton et al. 2011). HPgV werden zwischen Menschen durch Sexualkontakt, Kontakt mit kontaminiertem Blut oder von Mutter zu Kind übertragen (Bhattarai und Stapleton 2012).

### 1.2.3.3 Hepacivirus

Das am besten charakterisierte Mitglied der Hepacivirus-Gattung ist das Hepatitis-C-Virus (Smith et al. 2016). HCV infiziert den Menschen und ist ein wichtiger Auslöser der chronischen Hepatitis. Ein weiteres Hepacivirus, GBV-B, wurde erstmals 1995 in Tamarinen beschrieben, in denen es eine akute Infektion und Leberveränderungen, auslöste, ähnlich wie bei einer HCV-assoziierten Hepatitis (Simons et al. 1995). Mehrere

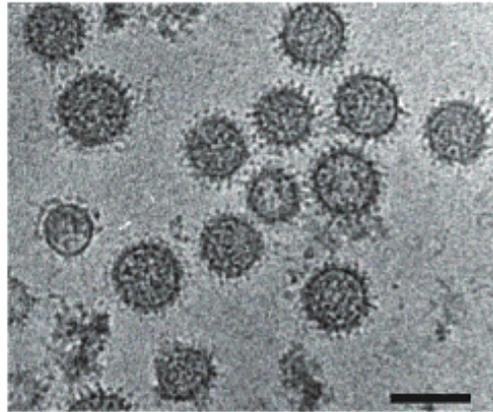
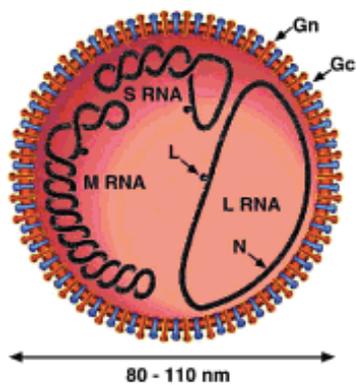
andere Hepaciviren wurden erst kürzlich in verschiedenen Primaten, Nagetieren und Fledermausarten beschrieben (Firth et al. 2014, Sibley et al. 2014, Drexler et al. 2013, Quan et al. 2013).

HCV-Infektionen sind weltweit bekannt. Es wird von einer unterschiedlichen Infektionsrate von bis zu 2,3 % in Industrieländern ausgegangen. In den Entwicklungsländern sind meist weniger Daten bezüglich der Prävalenz vorhanden. In China wird von einer Prävalenz von ca. 3,2 % ausgegangen. Die höchste Seroprävalenz hat Ägypten mit 22 % (Shepard et al. 2005). Zudem wird auch eine höhere Infektionsrate bei Patienten mit sexuell übertragbaren Erkrankungen wie HIV angenommen. Knapp 40 % der HIV-Patienten hatten eine nachweisbare HCV-Viruslast im Blut (Stapleton et al. 2011).

#### 1.2.4 *Bunyavirales*

Die Ordnung der *Bunyavirales* umfasst zur Zeit die 10 Virusfamilien *Arenaviridae*, *Cruliviridae*, *Fimoviridae*, *Hantaviridae*, *Myoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae*, *Wupedeviridae* (Knipe et al. 2006, ICTV 2018). Bekannte Vertreter sind beispielsweise die Moskito-übertragenen Orthobunyaviren Bunyamwera Virus oder La Crosse Virus (Familie *Peribunyaviridae*) oder das Zecken-übertragene Krim-Kongo-Fieber Virus (engl. *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, CCHFV, Familie *Nairoviridae*). Die ersten Symptome der Infektionen durch Bunyaviren zeigen sich unspezifisch mit Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, allgemeiner Schwäche sowie Atemwegssymptomen. Wie bei den Alphaviren beschrieben, kann auch hier ein biphasischer Krankheitsverlauf auftreten, bei denen sich die Patienten vorübergehend besser fühlen. Sobald genug virusneutralisierende Antikörper gebildet werden, reduziert sich die Virämie und die vollständige Genesung tritt ein. Jedoch treten auch schwere Verlaufsformen mit hämorrhagischem Krankheitsbild, schweren Enzephalitiden sowie Multiorganversagen auf (von Stebut 2015, Duygu et al. 2012).

Das Erscheinungsbild der Bunyaviren ist pleomorph mit einem Partikeldurchmesser von 100-120 nm und einer sphärischen Form.



**Abb. 4:** Graphische Darstellung eines Bunyaviruspartikels. Die Viruspartikel sind pleomorph, häufig sphärisch geformt und haben einen Durchmesser von ca. 100 nm. Die Glykoproteine in der Hüllmembran sind gekennzeichnet mit Gn und Gc. Die Hülle umgibt die drei einzelsträngigen RNA-Nukleokapside L-, M-, S Segment. (Abbildung aus: Bunyaviridae. Virus taxonomy; eighth report of the international committee on taxonomy of viruses).

Die Viren sind umhüllt und besitzen ein negativ orientiertes, segmentiertes einzelsträngiges RNA-Genom, das in die Segmente L-, M- und S-Segment (steht für large, medium, small) unterteilt ist (Modrow et al. 2010). Das L-Segment kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und das M-Segment für ein Polyprotein, welches posttranslational in die zwei Glykoproteine Gn und Gc gespalten sowie für ein Nichtstrukturprotein (NSm). Das S-Segment codiert für das Nukleokapsidprotein (N) und ebenfalls für ein Nichtstrukturprotein (NSs).

Moskito-assoziierte Viren bzw. Arboviren findet man beispielsweise in den Familien *Peribunyaviridae*, *Phasmaviridae* und *Phenuiviridae*. Die Familie *Phenuiviridae* wurde wie die gesamte Ordnung *Bunyavirales* neuklassifiziert und umfasst aktuell 15 Genera (ICTV 2019). Das bekannteste Genus *Phlebovirus* enthält wichtige human- und tierpathogene Erreger, z. B. RVFV und Uukuniemi Virus (UUKV, Bird et al. 2009, Palacios et al. 2013).

Das neue Genus *Goukovirus* beinhaltet die Prototypspezies Gouléako Virus (GOLV) und die Spezies Cumuto Virus (CUMV) und *Yichang insect virus* (Auguste et al. 2014, Li et al. 2015, Junglen 2016).

Gouléako-Virus, isoliert aus Moskitos aus Westafrika, kann nur in Insektenzellen, nicht jedoch in Vertebratenzellen replizieren und ist somit das erste beschriebene insektenspezifische Bunyavirus (Marklewitz et al 2011). Aufgrund seiner großen phylogenetischen Distanz zu den anderen Bunyaviren und durch Unterschiede in der Genomorganisation (kürzeres Genom, keine Nichtstrukturproteine), konnte es keinem der bekannten Genera zugeordnet werden. Goukoviren zeigen in phylogenetischen Analysen entfernte Verwandtschaft zu Phleboviren.

Seit wenigen Jahren ermöglicht die Tiefensequenzierung eine schnellere und umfassende Erhebung der Virendiversität in erheblichem Maße (Brinkmann et al. 2016). 2009 konnte aus dem Zellkulturüberstand einer infizierten Insektenzelllinie (C6/36) aus Thailand das Phasi Charoen Virus (PhaV) aus *Aedes aegypty* Larven isoliert werden. Eine Aussage über die Pathogenität konnte bisher nicht getroffen werden (Yamao et al. 2009). Anzunehmen ist jedoch eine Wirtsspezifität die sich auf Insekten beschränkt. Ebenfalls über die Tiefensequenzierung wurde ein *Bunyavirus* aus *Aedes aegypty* in naher Verwandtschaft zu PhaV beschrieben, das Phasi Charoen-like Virus (PCLV) (Chandler et al. 2014). PhaV wie auch PCLV zeigen eine geringe Homologie zum UUKV sowie dem RVFV aus dem Genus Phlebovirus. Aktuelle phylogenetische Analysen definieren die Viren PhaV, PCLV wie auch Wutai Mosquito Virus, isoliert aus Moskitos aus China, zugehörig zu einem eigenen Genus, genannt *Phasivirus*, welches von allen derzeit etablierten Bunyaviren gleichermaßen entfernt ist. Das Genus steht in basaler phylogenetischer Beziehung zu den Genera *Phlebovirus* und *Guokovirus*. Die S- und L-Segmente haben Längen von 1,1–1,5 bzw. 6,8 kb. Das M-Segment variiert erheblich in der Größe und ist zwischen 3,4 und 4,4 kb lang. Es wurden bislang keine kodierenden Regionen für weitere Nichtstrukturproteine identifiziert (Junglen 2016).

Das neue Genus *Herbevirus* (Familie *Peribunyaviridae*) beinhaltet ebenfalls insektenspezifische Viren, jedoch mit Verwandtschaft zu Orthobunyaviren (Familie *Peribunyaviridae*). Die Vetreter Herbert Virus (HEBV), Tai Virus (TAIV) und Kibale Virus (KIBV) wurden aus Moskitos aus Zentral- und Westafrika isoliert und können wie die Goukoviren nur in Insektenzellen replizieren (Marklewitz et al. 2013).

Bei den oben genannten Viren ist das geographische Vorkommen an den jeweiligen Vektor gekoppelt. Die fortschreitende Klimaerwärmung, so ist anzunehmen, wird das

Vordringen aus ihrem ursprünglichen Verbreitungsgebiet in weitere Regionen begünstigen (Lafferty und Mordecai 2016).

#### 1.2.5 *Mesoniviridae*

Die Familie *Mesoniviridae* wurde erstmals im Jahre 2011 beschrieben (Nga et al. 2011, Zirkel et al. 2011). Es ist die neueste Virusfamilie der Ordnung *Nidovirales*. Weitere bekannte Virusfamilien dieser Ordnung sind *Coronaviridae*, *Arteriviridae* und *Roniviridae*. Alle Nidoviren besitzen ein nicht-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom mit Plus-Polarität, wobei die Mesoniviren eine mittlere Genomlänge (20 kb) im Vergleich zu den anderen bekannten Nidoviren (13-30 kb) aufweisen. 2011 wurden das Cavally Virus (CavV) und das Nam Dinh Virus (NDiV) erstmals aus Moskitos isoliert. Dies geschah unabhängig voneinander, sowohl an der Elfenbeinküste als auch in Vietnam (Nga et al. 2011, Zirkel et al. 2011). Basierend auf der Genomorganisation konnten CavV und NDiV in die Ordnung *Nidovirales* eingeordnet werden und bilden hier die Spezies Alphamesonivirus-1 (Subgenus *Namcalivirus*) im bisher einzigen Genus *Alphamesonivirus*. Das Genus *Alphamesonivirus* umfasst aktuell 8 Subgenera mit insgesamt 9 Virusspezies.

Bei Mesoniviren handelt es sich um die ersten beschriebenen insektenspezifischen Viren innerhalb der Nidoviren, eine Replikation in Vertebratenzellen konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Studie von der Elfenbeinküste zeigte, dass neben CavV noch weitere Mesoniviren, z. B. Hana Virus, Nsé Virus und Meno Virus aus verschiedenen Moskitospezies der Genera *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* und *Uranotaenia*, isoliert werden konnten (Zirkel et al. 2013). Hierbei zeigte sich, dass *Culex* Moskitos die höchste Infektionsrate besitzen. Es wurde ein deutlicher Anstieg in der Virushäufigkeit von Primärregenwald zu menschlich modifizierten Gebieten nachgewiesen (Zirkel et al. 2011, Junglen et al. 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass einige Viren ihren Ursprung im Regenwald hatten und sich in menschliche Siedlungen ausgebreitet haben.

### 1.3 Beschriebene moskitoübertragene Viren und deren Vektoren in Westafrika mit Fokus auf Ghana

In tropischen und subtropischen Gebieten ist die höchste Diversität an Moskitos zu finden. Daher ist zu vermuten, dass auch die Diversität an Arboviren und insekten-

restringierten Viren in diesen Gebieten besonders hoch ist. Tatsächlich findet man in keiner Klimazone der Erde eine solch ausgeprägte Diversität von Arboviren wie in den Tropen. In tropischen Gebieten treten gehäuft durch Arbovirusinfektionen verursachte Epidemien auf (Gubler 2004, Cavrini et al. 2009, Caminade et al. 2010). Allerdings sind im tropischen Afrika nur begrenzte Möglichkeiten zur gezielten Diagnostik von Arbovirosen vorhanden. Daher ist zu vermuten, dass Arbovirosen aufgrund der unspezifischen Symptome, wie Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit, häufig als Malaria oder eine bakterielle Infektion fehldiagnostiziert werden.

### 1.3.1 Gelbfiebervirus

Gelbfieber ist eine akute Infektionserkrankung welche durch das YFV hervorgerufen wird. Ghana gilt für Gelbfieber als Endemiegebiet. Die letzten Epidemien in Ghana wurden 1993, 1996 und 2003 beschrieben. Zwischen 1990 und 2004 wurden in Ghana 227 Gelbfiebererkrankungen offiziell registriert (Monath 2005, 2006), nicht jedoch in der Ashanti-Region (Esená et al. 2013) Die WHO empfiehlt eine Gelbfieberimpfung bei Säuglingen in endemischen Gebieten, so auch in Ghana. Eine Routineimpfung gegen Gelbfieber wird in Ghana durch das Gesundheitsministerium bei Säuglingen von 9 Monaten empfohlen (Osei-Kwasi et al. 2001). Durch eine verstärkte Politik- und Öffentlichkeitsarbeit erreichte Ghana im Jahr 2004 eine Immunisierung der Säuglinge von 9 Monaten von ca. 81 % (Monath 2006).

### 1.3.2 Dengue Virus

Dengue ist eine systemische Infektion welche durch *Aedes* Moskitos (hauptsächlich *Ae.aegypti*) vor allem in den Regenwäldern Asiens und Afrikas auf Primaten und den Menschen übertragen wird. Die stark angepassten *Aedes aegypti* Moskitos bevorzugen eine Eiablage in künstlichen, mit Wasser gefüllten Behältern, wie Autoreifen, Regentonnen und Müll. Diese finden sie zunehmend in menschlicher Nähe (Gubler 1998).

Klinisch kann Dengue in Form von leichten Fieberschüben bis hin zu einer Schocksymptomatik imponieren. Das klassische Dengue Fieber ist eine Erkrankung älterer Kinder oder Erwachsener, meist gekennzeichnet durch plötzlich auftretendes Fieber, begleitet von einer Vielzahl an unspezifischen Symptomen wie Cephalgien, Myalgien und Arthralgien, sowie Übelkeit und Erbrechen. Hämorrhagische Manifestationen sind

nicht selten und reichen von Hautblutungen in Form von Petechien oder Purpura über Epistaxis und Zahnfleischbluten bis hin zu gastrointestinalen Blutungen. Das Dengue Hämorrhagische Fieber betrifft Kinder unter 15 Jahren sowie Erwachsene nach einer Zweitinfektion mit einem anderen Serotypen. Die Symptome sind schwer von dem Dengue Fieber zu unterscheiden. Auch hier zeigt sich ein plötzlicher Fieberbeginn mit z.T. schweren Blutungskomplikationen. Zudem werden die serologischen Parameter einer Leuko- sowie Thrombozytopenie und relative Hämodilution als Zeichen eines „Kapillarlecksyndroms“ beobachtet. Vor allem in Folge der Blutungskomplikationen sowie des Kapillar-Lecks kann es zu einem fulminanten Schockgeschehen mit begleitendem Multiorganversagen kommen (Gubler 1998, WHO 2009).

Gegenwärtig gibt es noch keinen lizenzierten Impfstoff, sodass Dengue eine lebensbedrohliche Krankheit bleibt. Dengue kommt überall in den Tropen vor, wobei es mehrere Faktoren gibt, die eine Ausbreitung unterstützen. Zum einen wird das globale Bevölkerungswachstum und die damit verbundene Urbanisierung, insbesondere in den Entwicklungsländern, beschrieben. Besonders die Verschlechterung der Wasser-, Abwasser- und Abfallentsorgungssysteme, die mit einer ungeplanten Verstädterung einhergehen, birgen ideale Lebensbedingungen für Moskitos und können somit zu einer vermehrten Übertragung von Viren bzw. Erkrankungen führen. Darüber hinaus sind die geografische Verteilung und die Populationsdichten von *Ae. aegypti*, insbesondere in den Tropengebieten, aufgrund der erhöhten Anzahl von Mückenlarven in der häuslichen Umgebung, angestiegen. Ein weiterer Faktor zur weltweiten Ausbreitung von Dengue wird im erhöhten Flugverkehr für Geschäfts- und Urlaubsreisen gesehen. Viele Reisende werden infiziert, wenn sie tropische Gebiete besuchen, werden aber erst nach ihrer Rückkehr krank, was zu einer ständigen Bewegung von Dengue-Viren in infizierten Menschen in alle Teile der Welt führt (Gubler 1998). Geschätzt gab es im Jahr 2010 ca. 390 Millionen Dengue-Fälle weltweit. Viele Erkrankungen blieben inapparent, jedoch bildeten ca. 96 Millionen Erkrankte Krankheitssymptome aus (Bhatt et al. 2013, Gubler 1998).

Dengue wird in 4 Serotypen (DENV 1-4) eingeteilt. In Westafrika wurden in den 1960er Jahren erstmalig DENV-1,-2, und -3 aus menschlichen Seren aus Nigeria extrahiert (Carey et al. 1971). Die letzten Ausbrüche von Dengue wurden in der Elfenbeinküste, ausgelöst durch DENV-2 und -3, in den Jahren 2006 und 2008 dokumentiert (WHO

2009). Vereinzelt ist Dengue auch in Ghana aufgetreten. Bisher wurde allerdings noch keine Epidemie nachgewiesen. Es bleibt jedoch Gegenstand der Forschung, da es in den angrenzenden Ländern, wie oben beschrieben, zu vereinzelt Ausbrüchen gekommen ist und mit einer zunehmenden Migration der Menschen über die Ländergrenzen hinweg, eine Übertragung möglich ist (Franco et al. 2010, Huhtamo et al. 2008, Amarasinghe et al. 2011). In Westafrika kommt DENV-2 am häufigsten vor (Franco et al. 2010).

### 1.3.3 West-Nil-Virus

Das WNV, ebenfalls zugehörig zu den Flaviviren, wurde erstmals 1937 in Uganda isoliert (Smithburn et al. 1940). In den folgenden Jahrzehnten zeigte sich eine weltweite Verbreitung des Virus vornehmlich durch Moskitos aus der Gattung *Culex* und *Aedes* (Haas et al. 2004). Ausbrüche von WNV wurden in Afrika, Asien, Europa, mittlerer Osten und Australien beschrieben. In den letzten Jahrzehnten wurden große Epidemien in Rumänien, Russland, Isreal und Nordamerika durch WNV ausgelöst. 1999 hat sich eine schwere Epidemie von Meningoencephalitiden in New York City gezeigt, für welche das WNV verantwortlich gemacht wurde. Innerhalb von 3 Jahren (1999-2001) wurden in den USA 142 Fälle von WNV mit 18 Todesfällen berichtet. Die meisten menschlichen WNV Infektionen verlaufen subklinisch mit unspezifischen Symptomen. Es werden aber auch komplizierte Verläufe mit tödlich verlaufender Meningoencephalitis berichtet. Die Häufigkeit einer schweren Infektion mit WNV nimmt mit dem Alter zu (Campbell et al. 2002).

Ein Ausbruch in Westafrika kann bisher nicht belegt werden. In einer klinischen Studie mit 1300 Serumproben von Menschen aus Ghana wurde keine akute Erkrankung des WNV nachgewiesen (Wang et al. 2009). Jedoch 4,8 % der Kinder, sowie knapp 28 % der Erwachsenen besitzen spezifische IgG Antikörper gegen WNV. Es wird angenommen, dass häufig eine Infektion innerhalb der ersten 30 Lebensjahren stattfand und sich anschließend eine lebenslange Immunität ausbildete.

### 1.3.4 Rift-Tal-Fieber-Virus

Das RVFV, ein Phlebovirus aus der Familie der *Phenuiviridae* löst das sogenannte Rift-Valley-Fieber (RVF) aus. Kennzeichnend sind die Epidemien bei Nutztieren mit hohen Abortraten trächtiger Tiere und einer hohen Sterblichkeit der Jungtiere (Gubler 2002,

Woods et al. 2002). RVFV wurde erstmals nach plötzlichen Todesfällen von ca. 4.700 Lämmern und Schafen auf einer Farm am Ufer des Lake Naivasha in Kenia beschrieben (Daubney et al. 1931). Seit dieser Zeit hat das RVFV zahlreiche Epidemien ausgelöst. Charakteristisch für die Infektion, nach einem Stich eines infizierten Moskitos, sind hohe Abortraten und Sterblichkeit bei Jungtieren von bis zu 100 % und bei ausgewachsenen Tieren von 10-20 % (Bird et al. 2009). Menschen infizieren sich durch Kontakt von Gewebe infizierter Tiere oder ebenfalls durch Moskitostiche. Infektionen beim Menschen sind in der Regel selbstlimitierende fieberhafte Erkrankungen, ähnlich zu Grippesymptomen. Bei ca. 1 % - 2 % der Betroffenen können sich jedoch schwere Komplikationen wie eine fulminante Hepatitis, Enzephalitis, Retinitis mit Erblindung oder hämorrhagische Erscheinungsformen ausbilden. Bei den schweren Verläufen liegt die Letalität bei ca. 10 % - 20 % (Madani et al. 2003, Grobbelaar et al. 2011).

RVFV wird durch verschiedene Moskito-Genera übertragen, hauptsächlich jedoch durch *Aedes* und *Culex*-Arten. Eine Zunahme der Moskitopopulation wird vor allem nach heftigen Regenfällen beschrieben (Lacaux et al. 2007). Ein erhöhtes RVFV Risiko wird in Westafrika für den nördlichen Senegal, südliches Mauretanien und Mali beschrieben (Caminade et al. 2011). Infektionen mit RVFV in Ghana wurden bisher nicht beschrieben. Angesichts der ernsten gesundheitlichen Folgen der RVF Epidemien, wird eine größere Investition in die Durchführung oder Berichterstattung der Überwachungstätigkeiten in Ghana empfohlen (Clements et al. 2007).

#### 1.3.5 Arbovirus Immunstatus

Über den Immunstatus der Bevölkerung Äquatorialafrikas gegen Arboviren ist wenig bekannt. In einer Studie wurden unspezifisch fieberhaft erkrankte Patienten aus Guinea auf Antikörper gegen verschiedene Arboviren bspw. WNV, YFV, DENV, CHIKV und Tahyna Virus (TAHV) untersucht. Es zeigte sich bei 63 % der erkrankten Patienten ein positiver Antikörperstatus hinsichtlich einer abgelaufenen Infektion (Jentes et al. 2010). Eine genaue Einschätzung über das Vorkommen von arboviralen Erkrankungen ist jenseits der großen Epidemien kaum möglich, da ausreichendes medizinisches Personal, eine konsequente Erregersuche und Kontrollen fehlen. Häufig liegt dies an einer nicht ausreichenden Infrastruktur und fehlenden finanziellen Mitteln in den Ländern Äquatorialafrikas.

### 1.3.6 Moskitovorkommen

Weltweit gibt es aktuell 3546 verschiedene Moskitospezies. Diese sind in 112 Genera eingeteilt (Harbach 2015). In Ghana sind bislang 24 Moskitogenera beschrieben, auf die sich 134 Spezies aufteilen (WRBU). Von den 24 Genera sind bisher 12 als Überträger von medizinisch relevanten Erkrankungen beschrieben (WRBU). Beispielfhaft kann hier *Aedes aegypti* genannt werden, bekannt für die Übertragung von DENV oder YFV, oder *Culex pipiens* als Überträger des Sindbis Virus. In Ghana sind verschiedene arbovirale Infektionen wie z. B. Gelbfieber, Dengue-Fieber oder West-Nil-Fieber nachgewiesen (Appawu et al. 2006, Bhatt et al. 2013).

## 1.4 Gegenstand der Forschung

### 1.4.1 Kumasi in Ghana, Afrika

Kumasi ist nach der Hauptstadt Accra die zweitgrößte Stadt in Ghana. Kumasi liegt in der Regenwaldzone von Westafrika und hat eine stetig steigende Einwohnerzahl von mittlerweile 1,2 Millionen. Ghana liegt äquatornah, hat ein feuchtwarmes Klima mit einem durchschnittlichen Niederschlag von ca. 1400 mm/Jahr und zwei eindeutigen Regenzeiten. Die Durchschnittstemperatur beträgt ca. 25 °C (Afrane 2004).

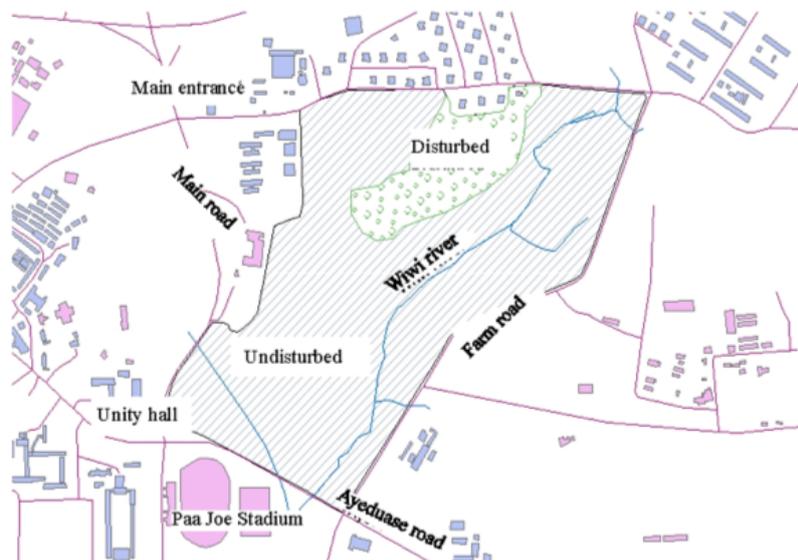


**Abb. 5:** Karte von Ghana im Kontext zu den umliegenden afrikanischen Ländern, sowie eine Vergrößerung mit Lupeneffekt auf die Lage der Fangpunkte im Stadtgebiet von Kumasi. Die Karten wurde mit Google Maps (<http://www.maps.google.de>) erstellt.

In Kumasi/Ghana lebte zum Zeitpunkt dieser Arbeit eine große Kolonie der Palmenflughunde *Eidolon helvum* in unmittelbarer Nähe zum Studiengebiet. Eine Infektion mit GB Viren wurde in einer anderen Gattung von Flughunden *Pteropus giganteus* bereits nachgewiesen (Epstein et al. 2010, Stapleton et al. 2011, Quan et al. 2013). Ob ebenso eine Infektion der in Ghana ansässigen Flughunden vorliegt, konnte bisher nicht aufgezeigt werden. Dennoch wurde ein möglicher Übertragungsweg durch Moskitos diskutiert.

#### 1.4.2 Botanischer Garten, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, KNUST

Der Botanische Garten auf dem Campusgelände in Kumasi ist der drittgrößte Garten von fünf Botanischen Gärten in Ghana. Der Botanische Garten wurde 1960 gegründet und besitzt eine Größe von 12,9 Hektar, die sich auf zwei eindeutig unterschiedliche Gebiete aufteilen. Ein Bereich des Gartens ist mit einer großen Fülle unterschiedlicher Pflanzen bepflanzt, während der Rest mit unkultiviertem Sekundärregenwald bewachsen ist (Abb. 6).



**Abb. 6:** Übersichtskarte der beiden unterschiedlichen Gebiete, gestörte (disturbed) und ungestörte (undisturbed) Fläche des Botanischen Gartens auf dem Campusgelände der Universität Kumasi (KNUST). (Grafik von PA Fordjour, Diversity and Distribution of Climbing Plants in a Semi-Deciduous Rain Forest, KNUST Botanic Garden, Ghana, 2008)

Einige wenige Maßnahmen wurden eingesetzt, um die Menschen vom unkontrollierten Betreten des Gartens abzuhalten. Der gesamte Garten wurde eingezäunt, Wachmänner beschützen den Eingang und versuchen den Garten vor Eingriffen wie wilder Rodung für Feuerholz, Bambus sammeln und Jagen der dort ansässigen Tiere zu schützen (AddoFordjour et al. 2008).

Bisher gibt es nur eine geringe Datenlage darüber, welche Viren in den Wald-, und Wohngebieten kursieren. Durch frühere Arbeiten in der angrenzenden Elfenbeinküste konnte die Prävalenz und Artenzusammensetzung von Arboviren und deren Vektoren im Tai National Park und angrenzenden Gebieten aufgezeigt werden (Junglen et al. 2009).

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es Moskitos im Botanischen Garten und einem Wohngebiet in Kumasi zu fangen, diese anschließend morphologisch zu bestimmen und auf Virusinfektionen zu untersuchen. Damit soll ein Überblick über das Vorkommen von Moskitoarten und deren Erreger erhalten werden.

Die Moskitos sollen mit generischen PCR Assays auf bekannte und unbekannte Viren getestet werden. Zusätzlich sollte versucht werden aus den Moskitos Viren in Zellkultur zu isolieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

1kb Plus DNA Ladder <sup>TM</sup>	Life technologies, Darmstadt
100bp DNA Ladder	Life technologies, Darmstadt
Ampuwa®	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Aqua bidest	Institut für Virologie UK, Bonn
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Life technologies, Darmstadt
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Life technologies, Darmstadt
Ethanol absolute	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ficoll 400	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hexaquart® plus	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Lambda-DNA	Fermentas GmbH, St Leon-Rot
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MgCl <sub>2</sub> 50mM	Life technologies, Darmstadt
Na <sub>2</sub> EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden
Primer	Biomers.net GmbH, Ulm
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Xylencyanol FF	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

#### 2.1.2 Lösungen und Puffer

Dubecco`s PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
--------------------	---------------------------

## Saccharoselösung 36% (Eigenherstellung)

36% Saccharose

H<sub>2</sub>O

Sterilfiltriert

Institut für Virologie, Bonn

## 2.1.2.1 PCR Puffer

10X Expand High Fidelity Buffer (15mM MgCl<sub>2</sub>)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

10X PCR-Puffer für Platinum® *Taq* (ohne MgCl<sub>2</sub>)

Life technologies, Darmstadt

5X First Strand Puffer (SSIII)

Life technologies, Darmstadt

5X Phusion® HF Puffer

Life technologies, Darmstadt

## 2.1.2.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Amphotericin B

PAA, Pasching, Österreich

C6/36-Medium (Eigenherstellung)

L-15 Medium (Leibovitz`s Medium), mit L-Glutamin

5%, 10% Fötale Kälberserum (FKS)

DMEM, high Glucose (4,5g/l), mit L-Glutamin

PAA, Pasching, Österreich

Fötale Kälberserum (FKS)

PAA, Pasching, Österreich

Imipenem

Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

L-15 Medium, mit L-Glutamin

PAA, Pasching, Österreich

Penicillin/Streptomycin

PAA, Pasching, Österreich

Vero E6/7-Medium (Eigenherstellung)

DMEM, high Glucose (4,5g/l), mit L-Glutamin

5% Fötale Kälberserum (FKS)

## 2.1.2.3 Nährmedien für One Shot® TOP10 Chemically Competent E.coli

## LB-Agar (Eigenherstellung)

- Standardrezeptur-

+ 5mg/ml Carbencillin

Nährmedienküche UK, Bonn

## LB-Flüssigmedium (Eigenherstellung)

- Standardrezeptur-

+ 5mg/ml Carbencillin

Nährmedienküche UK, Bonn

## S.O.C. Medium

Life technologies, Darmstadt

## X-Gal

Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe

## 2.1.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

## Agarose Gel 1%, 2%

1%, 2% Agarose

TAE-Puffer

Institut für Virologie UK, Bonn

## Ladepuffer 6x (Eigenherstellung)

0,13% Bromphenolblau

0,13% Xylencyanol FF

15% Ficoll 400

5x TAE-Puffer

Institut für Virologie UK, Bonn

## TAE-Puffer 50X (Eigenherstellung)

242g Tris

100ml 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0)

57,1ml Essigsäure

ad 1 Liter mit aqua bidest

Institut für Virologie UK, Bonn

## 2.1.3 Kits

## ExoSAP-IT For PCR Product Clean-Up Kit

Affymetrix, Santa Clara, USA

## MinElute Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

## QIAamp® Viral RNA Mini Kit

Qiagen, Hilden

## NulceoSpin® RNA Virus

Macherey-Nagel, Düren

## Seqlab PCR-Reinigungs-Kit

Seqlab GmbH, Göttingen

TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing      Life technologies, Darmstadt

#### 2.1.4 Enzyme

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase      Life technologies, Darmstadt

Platinum® *Taq* DNA Polymerase      Life technologies, Darmstadt

SuperScript™ III Reverse Transcriptase      Life technologies, Darmstadt

#### 2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

One Shot® TOP10 Chemically Competent *E.coli*

Life technologies, Darmstadt

pCR2.1 Vector

Life technologies, Darmstadt

pCR®4-TOPO®

Life technologies, Darmstadt

#### 2.1.6 Zelllinien

C6/36

Insektenzellen:

Moskitozellen aus der Asiatischen Tigermücke (*Aedes albopictus*)

Larve Klon C6/36

ECACC Nr. 89051705

Vero E6/7

Vertebratenzellen:

Nierenzellen aus der afrikanischen grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops*)

ECACC Nr. 85020205

#### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Clear Seal Diamond,

ABgene (Einschweißfolie für 96er Plates)

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,  
USA

Cryotubes (1ml)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Eppendorf AG Combitips® (25ml)

Eppendorf AG, Hamburg

Filter-Pipettenspitzen für Mikropipetten	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Flat Cap Strips	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Luer-Lok™ Spritze (3ml)	BD, Franklin Lakes, USA
Millex® – GV 0,22µm	Merck Millipore, Billerica, USA
Parafilm® „M“ Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Tube (0,2ml Flat Cap)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR Tube (0,5ml)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Precellys-Keramikkugeln 1,4mm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
QPCRTube Stripes (0,2ml)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Standard 96 Well PCR Plates	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stahlkugel 5mm	Heinrich Hermanns, Bonn
Whatman® S&S FP30/0,2µm CA-S	Whatman GmbH, Dassel
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> )	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturpipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten (6-, 24-Well)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber (24cm, 32cm)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

### 2.1.8 Technische Geräte

Autoklav	Thermo Fischer scientific Inc., Waltham, USA
<i>BG Sentinel Trap</i> ®	Biogents AG, Regensburg
Brutschränke:	
Galaxy 170 S (37,0°C; 5%CO <sub>2</sub> )	New Brunswick Scientific, Eppendorf AG, Hamburg
Heraeus B 6200 (28°C)	Thermo Fischer scientific Inc., Waltham, USA
Heraeus Hera Cell 240 (28°C) (37°C; 5%CO <sub>2</sub> )	

	Thermo Fischer scientific Inc., Waltham, USA
CDC Light Trap	John W. Hock Company, USA
Eismaschine AF 100	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Feather® Disposable Scalpel No. 11	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Federstahlpinzetten, spitz	Fiebig Lehrmittel, Berlin
Geldokumentation:	
AlphaDigiDoc™ RT (Alpha Innotech Corp.)	Cell Bioscience Inc., Santa Clara, USA
Olympus Camedia C-5060	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
UV-Tisch AITM.26 (Alpha Innotech Corp.)	Cell Bioscience Inc., Santa Clara, USA
Visi-Blue™ UV Transilluminator	UVP, Cambridge, GBR
Gelkämme:	
Kamm 1.5mm/6 Zähne für Gelsystem Mini	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm 1.5mm/10 Zähne für Gelsystem Mini	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm 1.5mm/12 Zähne für Gelsystem Maxi	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm 1.5mm/20 Zähne für Gelsystem Maxi	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm 1.5mm/25 Zähne für Gelsystem Maxi	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm ~1mm/12 Zähne	Eigenkonstruktion UKB
Gelkammern:	
Gelkammer (Eigenkonstruktion)	Washington University, Saint Louis, USA
Owl B2 EasyCast Mini Gel System	

	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PerfectBlue Gelsystem Maxi S	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PerfectBlue Gelsystem Mini S	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kühlschrank	Bosch
Mikroskopie:	
Canon IXUS 95IS	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Digitalkamera Adapter mit C-Mount 1x	ProMicron, Kirchheim/Neckar
Inversmikroskop AE20	Motic Incorporation Ltd., Hong Kong, Japan
Stereomikroskop Stemi DRC	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Mirkowelle Micromat	AEG, Nürnberg
Pipetten:	
Mikroliterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer <i>accu-jet</i> <sup>®</sup> Pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Einmalskalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilbank Gelaire flow BSB4A	Flow Laboratories, Merckenheim
Stromquelle für Geldokumentation:	
Biometra Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Whatman Biometra Power Supply EC-105	Biometra GmbH, Göttingen
Thermozykler:	
Vapo protect Master cycler pro	Eppendorf AG, Hamburg

Vapo protect Master cyclers pro S	Eppendorf AG, Hamburg
Master cyclers gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Gene Amp PCR System 2400	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tiefkühler	AEG Elektrolux
Tischschüttler Certomat <sup>RS</sup> II	Sartorius AG, Göttingen
Inkubationshaube Certomat <sup>®</sup> H	Sartorius AG, Göttingen
Tissue-Lyser Qiagen <sup>®</sup>	Retsch GmbH, Haan
Adapter-Set 2x24	Qiagen, Hilden
Vortex-1 Genie Touch mixer	Scientific Industries Inc., New York, USA
Vortex Neolab 7-2020	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Zentrifuge:	
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fischer scientific Inc., Waltham, USA
Sprout <sup>™</sup> Tischzentrifuge	Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, USA
Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Sammeln der Moskitos

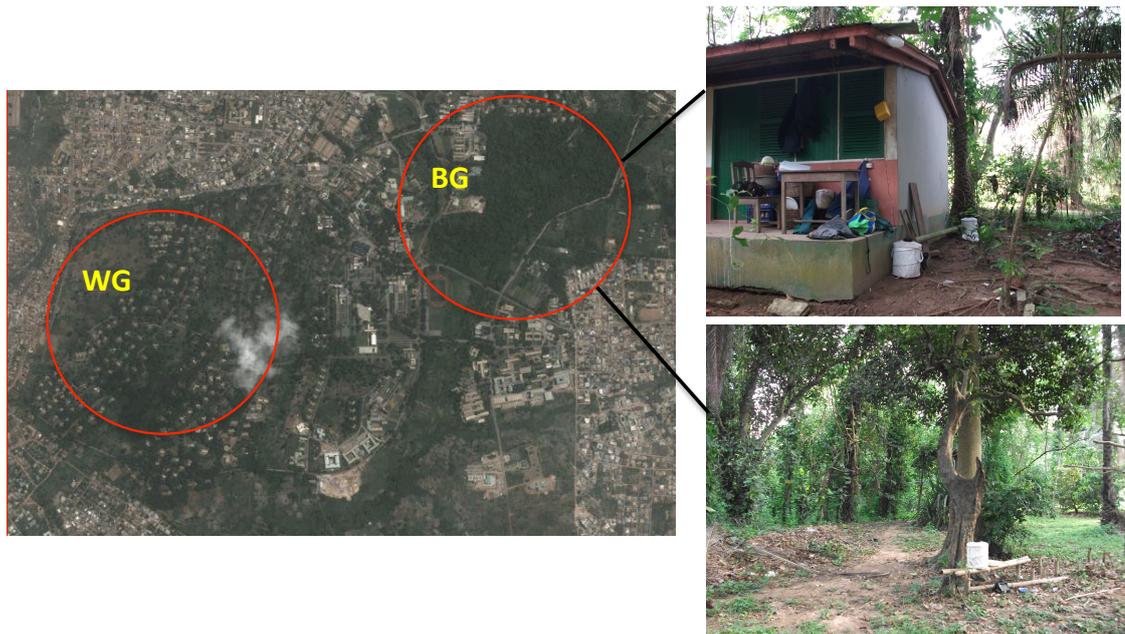
Die Moskitos wurden über einen Zeitraum von fünf Wochen, von Februar bis März 2011 (Übergang der Trocken- in die Regenzeit), auf dem Gelände der Universität von Kumasi, Ghana gefangen. Es wurden zwei verschiedene Fangpunkte ausgewählt. Zum einen wurde in Wohngebieten gefangen, um die Nähe zum Menschen zu gewährleisten. Als zweiter Fangort diente der botanische Garten, da sich hier eine große Kolonie von Palmenflughunden (*Eidolon helvum* ca. 400.000 Tiere) aufhielt.

#### 2.2.1.1 Botanischer Garten, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, KNUST

Der botanische Garten auf dem Campusgelände in Kumasi ist der drittgrößte von fünf Botanischen Gärten in Ghana. Neben einem unkultivierten Bereich der als Sekundärregenwald bezeichnet werden kann, gibt es einen angelegten Bereich mit einer großen Vielfalt an Pflanzen und Bäumen.

Die Moskitos dieser Arbeit wurden an zwei verschiedenen Punkten auf dem Universitätsgelände (Abb. 7) folgendermaßen gefangen:

- 1.) Im Botanischen Garten (BG) wurden drei Fallen pro Fangnacht an verschiedenen Orten aufgestellt. Meist standen sie bodennah oder auf kleinen Anhöhen. Es wurde sowohl an dem kleinen Bach, der den Botanischen Garten durchkreuzt, gefangen, als auch bei dem Haus der Nachtwächter und auf fast freier Fläche.
- 2.) In der umgebenen Wohngegend (WG) wurde mit zwei bis drei Fallen pro Fangnacht im Garten, direkt am Haus, in der Nähe von Lichtquellen oder in vollständiger Dunkelheit gefangen. Ebenfalls wurde die Nähe zu Wasserbehältern wie Regentonnen oder Zisternen gesucht, sowie in der Nähe der Terrasse gefangen.



**Abb. 7:** Satelitenbild der beiden Fanggebiete auf dem Universitätsgelände KNUST Kumasi/Ghana. Das Bild wurde mit Google Maps (<http://www.maps.google.de>) erstellt. BG: Botanischer Garten, WG: Wohngebiet. Beispielhaft sind hier zwei der unterschiedlichen Fangorte im Botanischen Garten dargestellt, oben in direkter Nähe zum Haus der Nachtwächter und unten im Schutz eines großen Baumes neben einer freien Fläche (Fotos privat).

#### 2.2.1.2 Moskitofallen

Die Moskitos wurden mit zwei unterschiedlichen Fallentypen gefangen. Zum einen mit den sogenannten Lichtfallen CDC *Light Traps* (Abb. 8), bei der sich oberhalb des Ventilators eine kleine Glühbirne befindet, die in Dunkelheit die Moskitos anlockt und sie dann durch den Ventilator in ein Auffangsäckchen befördert. Diese Fallen wurden meist 1,5 m bis 2 m über dem Boden aufgehängt.

Zum anderen wurde mit *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup> gefangen (Abb. 8), die einen großen tonnenartigen Aufbau haben. Die Falle ist durch eine Gaze, bis auf ein zentral gelegenes Loch verschlossen. Über die Oberfläche entweichen die Lockstoffe. Die Moskitos werden durch den Luftsog eines Ventilators im Inneren der Falle durch ein Zwischenrohr in ein darunter hängendes Auffangsäckchen gesogen. Die einströmende Luft steigt dann außen durch die Tonne wieder nach oben und trägt somit die Lockstoffe aus dem Innern der Falle nach außen.



**Abb. 8:** Verwendete Moskitofallentypen Links ist eine CDC *Light Trap* dargestellt mit der nachts mit Hilfe einer Lichtquelle und Lockstoff die Moskitos gefangen wurden. Das Foto stammt von der Website des Herstellers (<http://johnwhock.com/products/mosquito-sandfly-traps/cdc-miniature-light-trap/>). Rechts ist eine *BG Sentinel Trap*<sup>®</sup> zu sehen, die vor allem in den Dämmerstunden eingesetzt wurde und bei der mit Hilfe eines Ventilators sowie Lockmitteln die Moskitos angelockt wurden. (Foto: privat)

Die Fallen wurden mit unterschiedlichen Lockstoffen befüllt. Es wurden Limburger Weichkäse, getragene Kleidungsstücke wie Socken oder T-Shirts, sowie Behälter mit verschiedenen Flüssigkeiten als Lockstoffe genutzt. Die Flüssigkeiten wurden ein paar Tage vor dem Gebrauch folgendermaßen hergestellt: eine große Plastikflasche wurde mit Pfützenwasser oder Wasser aus einer Regentonne gefüllt und zusätzlich wurden einige gehäufte Esslöffel Zucker und unterschiedliche Gräser, die im Botanischen Garten wachsen, hinzugegeben. Die Flasche wurde nun für ca. 2-3 Tage in die pralle Sonne gestellt, sodass Zersetzungs- und Gärungsprozesse beschleunigt wurden. An jedem Fangpunkt wurde je ein oder zwei der drei Lockstoffe für mindestens eine Fangnacht eingesetzt.

Die Fallen wurden vor der Dämmerung gegen 17 Uhr aufgestellt und liefen dann bis zum kommenden Morgen nach Sonnenaufgang bis ca. 6.30 Uhr. Zusätzlich wurde an sechs Tagen auch von 6.30 bis 17 Uhr gefangen.

## 2.2.2 Ökologische Analysen

### 2.2.2.1 Bildung von Fangeinheiten (FE)

Um die Anzahl der verschiedenen vorkommenden Moskitospezies an den beiden Fangpunkten zu bestimmen, wurde eine standardisierte Fangeinheit (FE) pro Fangpunkt gebildet. Dies ist nötig um einen Unterschied der Fallenzahl und unterschiedliche Anzahl an Fangtagen an beiden Fangorten auszugleichen. Da eine Leerung der Fallen zwei Mal pro Tag stattfand, betrug eine FE 12 Stunden. Die Anzahl der Moskitos pro Fangeinheit an einem Fangort ergibt sich somit aus der Häufigkeit einer gefangenen Moskitospezies dividiert durch das Produkt der Faktoren Fallenzahl und Fangtageanzahl.

$$\text{Moskitos/Fangeinheit [M / Fe]} = \frac{\text{Anzahl Moskitos}}{(\text{Anzahl Fallen} \times \text{Anzahl Tage})}$$

### 2.2.2.2 Bestimmung der Diversität

Der Shannon Index ist eine mathematische Größe zur Beschreibung und Errechnung der Diversität. Er beschreibt die Artenvielfalt innerhalb einer Gruppe von Arten, in dieser Arbeit Moskitos, und betrachtet dabei sowohl die Zahl der einzelnen Arten als auch die Anzahl der einzelnen Individuen je Art (Abundanz) (Shannon und Weaver 1949).

Berechnet wird der Shannon Index nach folgender Formel:

$$H = -\sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

mit  $p_i = \frac{n_i}{N}$

S = Anzahl der vorhandenen Spezies  
 pi = relative Häufigkeit der jeweiligen Spezies i  
 ni = Anzahl der jeweiligen Spezies i  
 N = Gesamtzahl aller Individuen

H wird kleiner je gleichmäßiger die Moskitoarten vertreten sind. Je unterschiedlicher die Verteilung desto größer wird H.

Der Simpson-Index ist ebenfalls ein Berechnungsmaß für die Diversität (Sodhi und Ehrlich 2010). Durch ihn wird die Wahrscheinlichkeit errechnet, dass zwei zufällig

gefangene Individuen eines Fangs nicht der gleichen Spezies angehören. Er errechnet sich wie folgt:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

$n_i$  = die Zahl der Individuen einer Art (i)  
 $n$  = Gesamtheit aller Individuen

$D = 0$  wenn alle Individuen einer Spezies angehören, somit keine Diversität vorherrscht. Je mehr sich  $D$  der 1 annähert desto größer die Diversität.

Die Äquität oder *Evenness* (Biodiversität) beschreibt wie häufig oder selten ein Individuum einer Art an einem der beiden Fangpunkte vorkommt, bezogen auf die Anzahl an Individuen der an dem Fangort vorkommenden Arten. Je höher die Äquität desto ausgeglichener ist die Individuenanzahl an dem ausgewählten Fangort (Pielou 1975).

$$\text{Äquität} = \frac{H'}{\ln(\text{Richness})}$$

*Richness* = Anzahl der Genera

### 2.2.3 Bestimmung der Moskitos

Die gefangenen Moskitos wurden in den Auffangsäckchen in das Labor transportiert und zur besseren Handhabung für zwei bis fünf Minuten in den Kühlschrank oder Tiefkühler gelegt. Anschließend wurden sie unter dem Binocular möglichst zeitnah bis zur Spezies bestimmt. Zur Bestimmung wurde die Bestimmungsliteratur von Edwards (Edwards 1941) und Jupp (Jupp 1996) verwendet. Mittels Digitalkamera wurden von einigen Exemplaren Aufnahmen bestimmter Körperpartien gemacht. Die Moskitos wurden nach Genus/Subgenus, Spezies, Fangpunkt, Geschlecht und Vitalität sortiert und in Cryotubes in flüssigem Stickstoff gelagert. Aufgrund einer Neuklassifizierung innerhalb des Genus *Aedes* wurde einige der gefangenen Moskitos nachträglich den Genera *Stegomyia* und *Diceromyia* zugeordnet (Reinert et al. 2004).

#### 2.2.4 Herstellung der Pools

Am Institut für Virologie in Bonn wurden die in Stickstoff gelagerten Moskitos weiterbearbeitet. Die Moskitos wurden einzeln in Schraubdeckel-Tubes gegeben und mit 500 µL gekühltem (4 °C) L-15 Medium ohne Zusätze bedeckt. Ebenfalls wurden 4-5 gekühlte Keramikugeln (1,4 mm) als Reibungsfläche in die Gefäße gegeben. Bei Spezies des Genus *Toxorhynchites* wurden statt Keramikugeln gekühlte Stahlkugeln (5 mm) verwendet.

Die Homogenisierung der Moskitos erfolgte mit jeweils drei Zyklen von je 30 Sekunden und einer Schlagfrequenz von 30 f/s im Tissue-Lyser. Falls noch grobe Partikel zu sehen waren, wurde ein weiterer Homogenisierungszyklus vorgenommen. Im Anschluss wurden die Proben in einer auf 4 °C gekühlten Tischzentrifuge für 10 Minuten bei 2500 rounds per minute (rpm) zentrifugiert.

Aus dem Überstand der Moskito-Homogenisate wurden im Anschluss Pools, bestehend aus 20 Tieren, gebildet. Hierzu wurden 50 µl Überstand von 20 homogenisierten Einzelmücken in einem Schraubdeckel-Tube zusammengeführt. Dabei wurden möglichst Tiere einer Art und eines Fangpunktes zusammengefasst. 500 µl des gepoolten Homogenisats wurden für Anzuchtversuche aliquotiert und 140 µl wurden für die RNA Extraktion in AVL-Puffer gegeben. Die Infektion der Zelllinien wurde direkt im Anschluss gemacht ohne die Proben nochmals einzufrieren. Das Homogenisat der Einzelmoskitos sowie die Aliquots für die RNA Extraktion und die restlichen 360 µl des Pools wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.5 Virusanzucht

##### 2.2.5.1 Kultivierung von Zellen

Für spätere Virus Anzuchtversuche wurden C6/36 (*Aedes albopictus*) und Vero E6/7 (*Ceropithecus aethiops*) Zellen verwendet. Diese beiden Zelllinien wachsen adhärent und werden zweimal pro Woche gesplittet und in frische Zellkulturflaschen umgesetzt. Für die C6/36 Zellen bedeutete dies, das alte Medium alle 2 bis 3 Tage zu entfernen und mit frischem L-15 Medium mit fötalem Kälberserum (FKS) aufzufüllen. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und im Medium resuspendiert. Je nach Zelldichte (1:2 bis 1:4) wurden die Zellen in frische

Zellkulturflaschen ohne Filter im Deckel umgesetzt und mit entsprechendem Volumen frischen Mediums aufgefüllt. Inkubiert wurden die C6/36 Zellen bei 28 °C ohne CO<sub>2</sub> Begasung. Die Vero E6/7 Zellen wurden ebenfalls alle 2 bis 3 Tage gesplittet. Das alte Medium wurde auch hier vorsichtig abgenommen und die Zellen anschließend mit Dulbecco's PBS Lösung gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA bedeckt und für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert wurden, um ein rasches Ablösen der Zellen zu erreichen. Danach wurden die Zellen in frischem DMEM Medium mit FKS resuspendiert, in frische Zellkulturflaschen mit Filter im Deckel überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. Die Vero E6/7 Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert.

#### 2.2.5.2 Infektionsversuche

Am Vortag der Infektion wurden die Zellen in 24-Well Platten ausgesät, wobei die Zellzahl pro Well bei den C6/36 Zellen  $2,5 \times 10^5$  und bei den Vero E6/7  $8 \times 10^4$  betrug. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Am Infektionstag sollte der Zellrasen mit einer Dichte von ca. 70-80 % vorliegen.

Das Infektionsvolumen pro Well einer 24-Well Platte betrug 300 µl. Diese geringe Menge an Medium soll die Anheftung der Viruspartikel an die Zellen erleichtern und die Zellen während der Inkubationszeit vor Austrocknung schützen. Dieses Volumen teilt sich in 200 µl Medium ohne Zusätze und 100 µl Moskitopool-Homogenisat. Für jede Zelllinie wurden zwei verschiedene Infektionsansätze durchgeführt. Zum einen wurden 290 µl des Moskitopools durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und jeweils 100 µl auf C6/36 und Vero Zellen gegeben. Im zweiten Infektionsansatz wurde das unfiltrierte Homogenisat direkt auf die beiden Zelllinien gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen für die Zelllinien wurden 700 µl Medium mit Zusätzen auf die Zellen gegeben und diese anschließend maximal eine Woche inkubiert. Zu den Zellen, die mit dem unfiltrierten Homogenisat behandelt wurden, wurden dem Medium in einer Konzentration von 1 % die Antibiotika Penicillin und Streptomycin sowie das Antimykotikum Amphotericin B hinzugefügt.

Die Wells wurden täglich nach Anzeichen eines cytopathischen Effektes (CPE) unter dem Lichtmikroskop untersucht und eventuelle Zellveränderungen dokumentiert.

Die Passage von infektiösem Zellkulturüberstand auf frische Zellen erfolgte jeweils in einem sieben Tage Rhythmus. Hierzu wurden wie oben beschrieben die Zellen am Vortag ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden dann mit 200 µl Medium ohne Zusätze bedeckt und mit 100 µl der vorangegangenen Passage infiziert. Anschließend wurde der Ansatz eine Stunde im jeweiligen Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 700 µl der beiden oben beschriebenen Mediumvarianten auf 1 ml Infektionsvolumen aufgefüllt.

#### 2.2.5.3 Virusernte

Sobald ein deutlicher CPE bei 80-100 % der Zellen in einem Well zu erkennen war, z.B. in Form von Zellcluster, Zellplatzen, Riesenzellen, oder ein Ablösen der Zellen, wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze vom Boden abgekratzt und mit dem Überstand resuspendiert. Anschließend wurde ein Aliquot von 100 µl für das weitere Passagieren abgenommen und der restliche Überstand in 2 Cryotubes aliquotiert und bei -80 °C eingelagert.

Bei der Ernte von Zellkulturflaschen wurden die Zellen vom Boden mit einem Zellschaber abgelöst und in 15 ml bzw. 50 ml Falconröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren.

#### 2.2.6 Ultrazentrifugation

Um Viruspartikel aufzukonzentrieren wurde eine große Zellkulturflasche von 175 cm<sup>2</sup> infiziert. Nach Ausbildung eines CPE`s wurden die Zellen wie unter 2.2.5.3 beschrieben geerntet. Der virushaltige Zellkulturüberstand wurde auf je 5 ml einer 36 %igen Saccharoselösung aufgeschichtet und in einer Ultrazentrifuge (Rotor: Sw 32 Ti) für 4 Stunden bei 4 °C und 28000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Zentrifugenröhrchen mit dem zurückgebliebenen Viruspellet kopfüber für zehn Minuten getrocknet. Das Pellet wurde in 200 µl PBS gelöst über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Probe stand dann für weitere Untersuchungen wie elektronenmikroskopische Diagnostik oder Tiefsequenzierung zur Verfügung.

### 2.2.7 RNA Extraktion aus den Moskito-Pools und infektiösem Zellkulturüberstand

Die Extraktion von RNA aus den homogenisierten Moskitos und den Moskitopools erfolgte mit Hilfe des QIAamp<sup>R</sup> Viral RNA Mini Kit. Hierzu wurden 140 µl der Probe in 560 µl AVL-Puffer gegeben, was zur Inaktivierung der vorhandenen Viren führte. Die RNA wurde nach Herstellerangaben extrahiert. Die Elution der RNA erfolgte in 2 x 40 µl AVE Puffer.

Die Extraktion von RNA aus dem infektiösen Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe des NulceoSpin<sup>®</sup> RNA Virus Kits. In diesem Protokoll wurden 150 µl des infektiösen Zellkulturüberstandes in 600 µl RAV1 Puffer gegeben und nach Herstellerangaben extrahiert. Die RNA wurde in 2 x 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

### 2.2.8 cDNA Synthese

Während der cDNA Synthese wird die RNA in einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und somit für die nachfolgende PCR Versuche vorbereitet.

Die Synthese erfolgte entweder mit unspezifischen Random-Hexamer Primern (R6 Primer) oder mit Sequenz-spezifischen Primern (Tab. 7). Bei der Synthese von spezifischer cDNA mit einem spezifischen Primer erfolgte nach der cDNA Synthese ein RNase H-Verdau, bei dem die RNA der übriggebliebenen RNA-cDNA Hybride abgebaut wurden. Die genaue Vorgehensweise und das Pipettierschema für die verwendete cDNA Synthesen sind in Tab. 1 und 2 ersichtlich.

**Tab. 1:** Standard cDNA-Synthese Protokoll mit SuperScript™ III RT und Random-Hexamer PrimernStandard cDNA-Synthese Protokoll

<u>Mix 1:</u>	Random-Hexamer Primer R6 (50 µM)	2 µl	<u>Cycler-Programm:</u> 98°C 3 min auf Eis 1 min  - Zugabe von Mix 2
	dNTPs (25 mM)	0,4 µl	
	H <sub>2</sub> O	7,1 µl	
	RNA-Probe	5 µl	
	$\Sigma$	14,5 µl	
<u>Mix 2:</u>	First-Strand Buffer (5X)	4 µl	50°C 60 min 70°C 15 min 4°C unendlich
	DTT(0,1M)	1 µl	
	SuperScript	0,2 µl	
	Mix	14,5 µl	
	H <sub>2</sub> O	0,3 µl	
	$\Sigma$	20 µl	

**Tab. 2:** Spezifische cDNA Synthese Protokoll SuperScript™ III RT und spezifische PrimerSpezifische cDNA-Synthese Protokoll

<u>Mix 1:</u>	spezifischer Primer (10 µM)	0,5 µl	<u>Cycler-Programm:</u> 98°C 3 min auf Eis 1 min  - Zugabe von Mix 2
	dNTPs (25 mM)	0,4 µl	
	H <sub>2</sub> O	8,1 µl	
	RNA-Probe	5 µl	
	$\Sigma$	14 µl	
<u>Mix 2:</u>	First-Strand Buffer (5X)	4 µl	55°C 60 min 70°C 15 min 4°C unendlich
	DTT (0,1M)	1 µl	
	SuperScript	1 µl	
	Mix	14 µl	
	$\Sigma$	20 µl	
	Rnase H	1 µl	- Zugabe 37°C 20 min -20°C Lagerung

### 2.2.9 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden und bildet eine Grundlage für alle weiterführenden Untersuchungen. Die PCR ermöglicht die selektive Vervielfältigung von bestimmten DNA Abschnitten mit Hilfe von spezifischen Primern und einer hitzestabilen Polymerase. Der komplementäre Einbau von frei vorliegenden Nukleotiden (nt) wird in diesem Bereich von der hitzestabilen Polymerase vollführt. Das Protokoll richtet sich dabei nach der Schmelztemperatur der Primer, der Länge des gewünschten Amplifikats und der verwendeten Polymerase.

#### 2.2.9.1 Konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR wurde als Enzym die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Das Enzym zeichnet sich einerseits durch eine besonders hohe Amplifikationsgeschwindigkeit (nur 15 s/kb) aus und andererseits durch seine Fehlerkorrekturfunktion (*Proofreading*). Das verwendete Protokoll ist in Tab. 3 ersichtlich.

**Tab. 3:** PCR-Protokoll und Cycler Programm

#### Standard PCR Protokoll

<u>Mix:</u> H <sub>2</sub> O	14 µl	<u>Cycler-Programm:</u>	
5X Phusion HF-Puffer	5 µl	95°C	3 min
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	95°C	20 sec
Forward Primer (10 µM)	1,25 µl	55°C	20 sec
Reverse Primer (10 µM)	1,25 µl	72°C	1 min
DMSO (100 %)	0,75 µl		
Phusion DNA Polymerase	0,25 µl		
	23 µl		
<u>Template cDNA</u>	2 µl	72°C	5 min
$\Sigma$	25 µl	4°C	unendlich

#### 2.2.9.2 *Nested* PCR und *seminested* PCR

Für den Fall, dass nach einer ersten PCR keine Produkte auf einem Agarose-Gel zu sehen waren, wurde eine *nested* oder *seminested* PCR durchgeführt. Für diese wurde als Template das PCR-Produkt aus der ersten PCR eingesetzt. Für die *nested* PCR

wurden zwei neue, eingerückte Primer verwendet. Es wurde somit ein kürzeres PCR Produkt gebildet. Für die *seminested* PCR wurde ein Primer aus dem ersten Lauf beibehalten und ein zweiter eingerückter Primer eingesetzt.

**Tab. 4:** PCR Protokoll der *nested*-PCR und Programm

### Nested PCR

<u>Mix:</u> H <sub>2</sub> O	37,8 µl	<u>Cycler-Programm:</u>		
10X PCR-Puffer	5 µl	95°C	3 min	
dNTPs (10 mM)	1 µl	95°C 55°C 72°C	15 sec 20 sec 30 sec	30x
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl			
Forward Primer (10 µM)	1,25 µl			
Reverse Primer (10 µM)	1,25 µl	72°C	5 min	
Platinum Taq DNA Polymerase	0,2 µl			
	49 µl			
<u>Template PCR Produkt 1. Runde</u>	<u>1 µl</u>	72°C	5 min	
Σ	50 µl	4°C	unendlich	

#### 2.2.9.3 *Touch Down* PCR

Wurde vermutet, dass die Primerbindungsstellen bei dem zu amplifizierenden Template Nukleotidaustausche besitzen könnten, wurde durch kontinuierliches Absenken der Annealingtemperatur die Chance auf ein Binden der Primer erhöht.

Für dieses Protokoll wurden den 35 regulären Zyklen weitere 10 Zyklen vorangestellt. Bei diesen 10 Zyklen nahm die Annealingtemperatur ausgehend von der gemittelten Primerschmelztemperatur pro Zyklus um 0,5 °C oder 1 °C ab. Die anschließenden 35 Zyklen liefen dann bei der erniedrigten Temperatur von Zyklus 10. Durch das Absenken der Temperatur wird die Amplifikation des gewünschten Fragmentes trotz Primer Fehlbildungsstellen ermöglicht. Nebeneffekte sind häufig unspezifische Bindungen und dadurch die Amplifikation unerwünschter Produkte.

**Tab. 5:** Protokoll der *Touch-Down* PCR und Cycler ProgrammTouch-Down PCR Protokoll

<u>Mix:</u> H <sub>2</sub> O	16,65 µl	<u>Cycler-Programm:</u>		
10X PCR-Puffer	2,5 µl	94°C	3 min	
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	94°C	15 sec	10x
MgCl <sub>2</sub>	1,25 µl	55°C	30 sec	
Forward Primer (10 µM)	1 µl	72°C	30 sec	
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	95°C	15 sec	40x
Platinum Taq DNA Polymerase	0,1 µl	50°C	30 sec	
	23 µl	72°C	30 sec	
Template cDNA	2 µl	72°C	5 min	
$\Sigma$	25 µl	4°C	unendlich	

Touch Down je 0,5°C pro Cycle

Wie bei der konventionellen PCR können an die *Touch Down* PCR eine *nested* oder *seminested* PCR angeschlossen werden. Wie unter 2.2.9.2 beschrieben, wurden ein oder zwei neue Primer, eingerückt auf dem Sequenzstück der ersten PCR, eingesetzt. Für den Mix wurde, wie oben beschrieben, ein Ansatz von 50 µl verwendet, das Cycler-Programm wurde an das zu erwartende Sequenzstück angepasst.

## 2.2.9.4 Generische PCR

Für das Testen auf neuartige Viren bestimmter Genera oder Familien werden generische PCR-Assays als Touch down PCR verwendet. Die eingesetzten Primer sind so angefertigt, dass sie Fragmente in hochkonservierten Bereichen der Sequenz binden. Dabei werden innerhalb der Genera variierende Nukleotide in dem konservierten Bereich mitberücksichtigt und an dieser Stelle seltene Nukleoside wie z. B. das Inosin eingesetzt. Dieses kann mit jedem der vier Basen (A, T, G und C) binden (degenerierte Primer). Mit diesem PCR Protokoll kann es vorkommen, dass genau die gewünschte Primervariante nicht ausreichend vorliegt und es somit zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.

Bei den nachfolgenden Untersuchungen stand vor allem die Amplifikation unbekannter Viren aus bekannten Virusfamilien im Vordergrund. In diesem Fall war die generische PCR die Methode der Wahl, um die unbekannt Viren in dem Probenmaterial nachzuweisen. Für diese Arbeit wurden die generischen PCR-Assays für die Untersuchung auf Alphaviren nach Grywna (Grywna et al. 2010), Flaviviren nach Moureau (Moureau et al. 2007), Orthobunyaviren nach Junglen (Junglen et al. 2009) und Phleboviren nach eigenem Design (AG Junglen, Institut für Virologie UK Bonn) benutzt.

#### 2.2.9.5 *Real Time* PCR (TaqMan™)

Die *Real Time* PCR ermöglicht neben der spezifischen Amplifikation eines Fragmentes ebenfalls die Quantifizierung mittels einer mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonde. Das Signal dieser Sonde wird während der PCR kontinuierlich gemessen. Somit ist die Menge des synthetisierten Amplikons in Echtzeit (*Real-Time*) möglich. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zur DNA Menge zu betrachten (Heid et al. 1996). Das *Real Time* PCR Protokoll ist in Tab. 6 zu sehen.

Nachfolgend wurde die *Real Time* PCR zur möglichen Detektion des Gouléako-Virus aus den Anzuchtversuchen verwendet (Junglen et al. 2009).

**Tab. 6:** *Real Time* PCR Protokoll und Programm

#### Gouléako TaqMan

<u>Mix:</u> H <sub>2</sub> O	15,55 µl	<u>Cycler-Programm:</u>	
10X Puffer	2,5 µl	95°C	2 min
MgCl <sub>2</sub>	2 µl	95°C	15 sec
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	60°C	30 sec <sup>#</sup>   45x
Gouv-L F (10 µM)	0,75 µl	4°C	unendlich
Gouv-L R (10 µM)	0,75 µl		
Gouv-L- TM (10 µM)	0,25 µl		
BSA (1:20)	0,5 µl		
Platinum Taq DNA Polymerase	0,2 µl		
	23 µl		
Template cDNA	2 µl		
Σ	25 µl		

<sup>#</sup>hier erfolgt die Messung

### 2.2.9.6 Design sequenzspezifischer Primer

Das Design der für die PCR benötigten spezifischen Primer erfolgte mit Hilfe des Programms Primer3, welches in der Software Geneious implementiert ist. Die Kriterien für die Auswahl eines spezifischen Primers sind die Anzahl der verwendeten Nukleotide (möglichst zwischen 18 und 30 nt), einer Schmelztemperatur von zwischen 50-60 °C sowie einem GC Gehalt zwischen 40 und 60 %. Hairpinstrukturen und Primer-Dimere sollen soweit möglich vermieden bzw. reduziert werden. Die sequenzspezifischen bzw. generischen Primer sind in der nachfolgenden Tabelle 7 aufgeführt. Die Synthese der Primer wurde von der Firma Biomers.net durchgeführt.

**Tab. 7:** Verwendete Primer und Sonden.

Zielsequenz	Name	Sequenz (5' > 3')	T <sub>m</sub>
Pan Alpha <sup>1</sup>	AlphaS2	GGTGCGATGATGAAGTCTGGGATGT	58,9°C
	AlphaS1	TTTAAGTTTGGTGCGATGATGAAGTC	54,7°C
	AlphaAS2.2	CTATGATATTGACTTCCATGTTTCAGCCA	55,3°C
	AlphaAS2.1	CTATGATATTGACTTCCATGTTTCATCCA	53,4°C
	AlphaAS1	GCATCTATGATATTGACTTCCATGTT	51,7°C
Pan Flavi <sup>2</sup>	PF1S	TGYRTBTAYAACATGATGGG	43,6 - 51,8°C
	PF2Rbis	GTGTCCCAICCNCGNTRTC	53,8 - 64°C
	PF3S	GCIATHHTGGTAYATGTGGYT	45,6 - 53,8°C
Pan Phlebo <sup>3</sup>	Ph F0	CAACTTGCAACHCTNAARGC	54,6°C
	Ph F1	TCAARAAGAMICAACATGGTGG	50°C
	Ph F2	GGACTIONAGAGATYATYGTITTGG	50°C
	Ph R1	TATGCCYTGCATCATYCCWG	51°C
	Ph R2	ACATGRTGACCYTGRTTCCA	50°C
	Ph R3	TGAAGCAGGANCCACCYTC	57,8°C
	Ph R3.2	TGAAGCATGCNCCHCCYTC	58,5°C
	Ph R4	GGAAGAARAAYTCTGARTTRTAYTCCA	56,7°C
Pan Orthobunya <sup>4</sup>	Orth F1	ATGCTGAYATGTICIAAGTGGTSTGC	53,6°C
	Orth F2	ACAAACTGCTATWAGRCAYGGKTG	50°C
	Orth F3	GKTGTCCACCGAGYTTDCA	53°C

	Orth R1	TGATTGTCATCGSTRGTGIACYA	45°C
	Orth R2	TCAARTTVCCCTTGGAKCCART	51°C
	Orth R3	GACATCTCGTAAGTYTCHCCMAT	50°C
Pan Nido	Mev F1	CCCATGGTCCCTTCAGAAGT	53°C
	MeV R2	GTTTCAGCCATRTATTCATGCCA	53°C
	MeV R3	CCAACCGCCATATTGTGC	52°C
	MeV F2	GGTGATTCAGAATTCATGCGT	52°C
GBV <sup>3</sup>	BtGBV-A/C-Mosq F a	GTGACACTTGACCCCACCAT	58°C
	BtGBV-A/C-Mosq F b	GTGACACTGGATCCAACCAT	56°C
	BtGBV-A/C-Mosq R a	TCCTTGACATTCTCCGYTG	57°C
	BtGBV-A/C-Mosq R b	TCTAGACACATTCGGCGYTG	57°C
	BtGBV-A/C-Mosq		
	Rnest a	ACGCCAACCAATAGGGGCCA	60,1°C
	BtGBV-A/C-Mosq		
	Rnest b	ACTCCAGTCAGAAGTGGCCA	58°C
	BtGBV-A-Rnest a	GACAATCCAGCAAAGAAGTTGAC	56,7°C
	BtGBV-A-Rnest b	TCAGTCCTGAAAAGAAGTTGAC	54,7°C
	GBV-C NS3 F1	GGTRWCCCTTGATCCCACCAT	59,2°C
	GBV-C NS3 F2	TCGGCWGAAYTGTCGATGCA	57°C
	GBV-C NS3 R1	CACATBGTCGGCTGAAC	54,1°C
	GBV-C NS3 R2	ACGCCGCGHACYTTTGCCCA	61,8°C
cDNA Synthese	R6-Primer	NNNNNN	12-24°C
Klonierung <sup>5</sup>	M13_F Mod	ATTCACTGGCCGTCGTTTTAC	53,5°C
	M13_R Mod	CACACAGGAAACAGCTATGAC	51,2°C
Real-Time Gouleako <sup>4</sup>	Gouv-L F	AACTGGAGGGAAGATGTGGAAGAG	55,8°C
	Gouv-L R	TCCTAGCCCACCCTCACAT	59,7°C
		6-FAM-CCGTTCCAAGGACACTCCAG	
	Gouv-L TM	AACAGCC-BHQ	62,8°C
Real-Time Herbert <sup>4</sup>	TFHV-F	AGAATGCTTTGTCAGTGG	50,8°C

TFHV-R	AGCAGCAACTTATAAAACAAATC	51,4°C
TFHV-TM	6-FAM-TTCTCCGCTAATAAAA-MGB	41,7°C

Spezifische Primer:

Orthobunya	Orth-P06-60R	GTTCCATATGTCATTTCTGTTGCAC	53,3°C
	Orth-P06-98R	GGCCTGGATCATTTTTTCATACCAGG	55,9°C
	Orth-P06-117R	CTATCATACCCAAATATATGGCCTGGAT	54,3°C
	Orth-P08-118F	GCCAGATTCTGCAATGGGAATTC	54,6°C
	Orth-P08-162F	GAATAGATGACCCTATTATTGAAATGACTA	51,5°C
	Orth-P13-119R	TACATAGACCCAGAGATATAACTTTCTTTTC	53,1°C
	Orth-P13-232F	GTTCCAAGGTAATTTGAATTATATGAGTTCT	52,9°C
	Orth-P13-345F	CAGTGTCTCTAGTTCATAGCGATGAC	55,1°C
	Orth-P13-371R	GTCATCGCTATGAACTAGAGACACTG	55,1°C
	Orth-P13-411R	GGCTATCAATTTTCTCAATCATGCATAC	53,7°C
	Orth-P13-565R	AATTCCTTTATTATGCTACTAATGTATGTTTT	51,3°C
	Orth-P13-587R	AAATCTATGATAAACTGAAAATGGTTCTCC	52,8°C
	Orth-P13-647R	ATAGAAATCTATGATAAACTGAAAATGGTTC	51,4°C
	Orth-P13-86R	TTGATCTTAAGCTTGGATTCAAGGCT	54,9°C
Phlebo	Ph_P2/3-F6	GTGCTTACGGCTGTGGGAATT	55,3°C
	Ph_P2/3-F7	AGATGGATACGAGCAGGGAGC	55,5°C
	Ph_P2/3-F8	CAAATTTTGGAAATTGTTTGATAA	45,1°C
	Ph-P15-110F	CCATAGCAGAGTTATTCGAGGACC	54,6°C
	Ph-P15-17F	GGCCTCTACTGTATGATAGGAAGAATG	54,5°C
	Ph-P15-213F	AACTCAAGAGGGGCAGCAA	53,8°C
	Ph-P15-240R	CTCAATATACGGCTCACCGGC	55,2°C
	Ph-P15-241F	ATTGCTGCCCTCTTGAAGTTA	53,9°C
	Ph-P15-294F	GATGTCTGAGGCTTTGGGAATCC	55,3°C
	Ph-P15-400F	GGCCTCTACTGTATGATAGGAAGAATG	54,5°C
	Ph-P15-405R	AGCATCAGCAGAACTGTTTAAGGT	54,7°C
	Ph-P15-431F	GCTTTAAGTTATTGCTGCCCTCT	55,4°C
	Ph-P15-456R	AGAGGGGCAGCAATAACTTAAAGC	55,4°C
	Ph-P15-45F	CTCCAGTAAGTACACAAGATCAAAAAGTG	54,4°C
	Ph-P15-666R	CTCAATATACGGCTCACCGGC	55,2°C
	Ph-P15-687F	AGGCATTCTGCACTACAGCTC	54,5°C
	Ph-P15-709R	GAGCTGTAGTGCAGAATGCCT	54,5°C

	Ph-P15-723F	TGCAATTATAGCCAGAGCAAAGGAG	55,4°C
	Ph-P15-81F	GCTCGCCAAGCTGAAAGGAA	55,4°C
	Ph-P15-829F	TCTTCTGATGACTCTTTCTTCAGCG	54,9°C
	Ph-P15-836F	ATGACTCTTTCTTCAGCGCTAGC	55,1°C
	Ph-P15-854F	CTAGCTGCCCAGTAGATGGC	54,1°C
	Ph-P15-857F	GCTGCCCAGTAGATGGCAC	55°C
	Ph-P15-877R	GCCATCTACTGGGCAGCTAG	54,1°C
	Ph-P17-180F	GATGTCTGAGGCTTTGGGAATCC	55,3°C
	Ph-P17-233F	ATTGCTGCCCCTCTTGAAGTTA	53,9°C
	Ph-P17-316F	AACTTCAAGAGGGGCAGCAA	53,8°C
	Ph-P17-59F	CAAAGGGATAGGGAATTTTAGGTGGG	55,2°C
	Ph-P17-84F	CAGTGCAGAACATGTATGATGGGT	55,2°C
	Ph_P15-F1	GGTAAAGCCGGTGAGCCG	55,7°C
	Ph_P15-F2	CTACAGCTCATCATTGTACCAT	49,8°C
	Ph_P15-F3	CCAGAGCAAAGGAGGTTATTAG	50,4°C
	Ph_P15-F4	GATGTGTCACCTACAATCTTCTG	49,6°C
	Ph_P15-R1	GGAATTATGGATTTGTTATGAGGG	49,7°C
	Ph_P15-R2	CGTCATGGTTTCTTCTGGA	49,1°C
	Ph_P15-R3	CCACACAAGACCCTAGCTATC	51,7°C
Sonstige	L12_P54_291R	GTAAGTCCATTGCAATACTATGGC	53,2°C
	L12_P54_334R	TGCAATTCCCATAGTTTTAGCAAAGTC	54,5°C
	H-L-4339R	ACATGCTCCTACAACCTGGAAATAG	52,6°C
	Phlebo_D10.1_R6	CTCTTGCTCTGAGACTAGGAATCC	54°C

<sup>1</sup>Grywna et al. 2010, <sup>2</sup>Moureau et al. 2007, <sup>3</sup>unpublished Virologie UK Bonn, <sup>4</sup>Junglen et al. 2009, <sup>5</sup>Modifizierte Primer nach TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing

### 2.2.10 Agarose Gelelektrophorese

Nach Abschluss der PCR-Läufe schloss sich in fast allen Verfahren (ausgenommen die *Real Time* PCR) eine Auftrennung im Agarosegel an. Die PCR Produkte wurden hierbei je nach Größe der zu erwartenden Fragmente in einem 1 % - 2 % Agarosegel aufgetrennt.

Die DNA ist negativ geladen und kann somit durch ein elektrisches Feld in einer Gelelektrophorese-Kammer zum positiven Pol laufen. Die Größe des Produktes bestimmt die Laufgeschwindigkeit im Gel und dadurch werden die Fragmente entsprechend ihrer Größe im Gel aufgetrennt. Durch den Zusatz vom interkalierenden

Ethidiumbromid werden die einzelnen DNA-Banden im Gel unter ultraviolettem (UV) Licht sichtbar gemacht. Die Ethidiumbromidmoleküle lagern sich in die Basen des Nukleinsäurefragmentes ein und fluoreszieren bei Anregung durch UV Licht. Diese im Gel als Banden erkennbaren Fragmente können dann mit Hilfe einer Kamera abfotografiert werden.

Bei der Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer durch Kochen aufgelöst, das Ethidiumbromid (0,1 µl/ml Endkonzentration) hinzugegeben und alles in die vorbereitete Gelelektrophoresekammer gegossen. Der zuvor eingesetzte Kamm bildete nachher die Taschen, um das PCR Produkt auftragen zu können. Nach Aushärten des Gels zu einer homogenen Gelmatrix wurde das PCR Produkt gemeinsam mit einem Ladepuffer (6x Puffer) aufgetragen. Zudem wurde in einer Tasche ein Marker aufgetragen, der Nukleinsäurefragmente bestimmter Größen enthielt und anhand dessen die Größe des PCR-Produktes abgeschätzt werden konnte. Die Auftrennung des PCR Produktes erfolgte abhängig von dessen Größe bei 100-160 V für 20-60 Minuten.

### 2.2.11 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von PCR Produkten ist häufig notwendig, um störende Komponenten, wie denaturierte Polymerasen, alte Primer und Salze zu entfernen, damit die folgenden Reaktionen nicht beeinträchtigt werden.

#### 2.2.11.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um die PCR Produkte sequenzieren zu können, wurden sie im Voraus aufgereinigt. Für diese Aufreinigung wurde entweder das SeqLab PCR-Reinigungs-Kit verwendet. Diese Aufreinigung erfolgte wie im Kit beschrieben mittels einer Affinitätssäule wodurch ebenfalls eine Aufkonzentration des PCR Fragmentes durch ein sehr kleines Elutionsvolumen von nur 10 µl erreicht werden konnte. Die Elution erfolgte stets mit dem mitgelieferten Elutionspuffer.

In den meisten Fällen wurde allerdings das ExoSAP-IT For PCR Product Clean-Up Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Verwendung von Exonukleasen und alkalischen Phosphatasen die freien Nukleotide und Primer zu degradieren und somit eine Aufreinigung zu erzielen.

### 2.2.11.2 Aufreinigung von DNA aus Agarose Gelen

Sobald in einem Agarose Gel mehr als nur die erwartete Bande zu sehen war, wurde die gesuchte Fragmentbande aus dem Agarose Gel herausgeschnitten. Für diese Aufreinigung wurde das PCR Produkt in größerer Menge aufgetragen und nach dem Auftrennen im Gel mit einem Skalpell sauber ausgeschnitten. Hierbei ist es wichtig, möglichst keine Nebenbanden mit auszuschneiden, die später die Sequenzierung stören oder gar unmöglich machen könnten.

Nun wurde die DNA aus dem Gelstück mittels MinElute Gel Extraction Kit entsprechend dem mitgelieferten Protokoll extrahiert und in einem möglichst kleinen Volumen, minimal jedoch 10 µl, eluiert.

### 2.2.12 Klonierung

Zur weiteren Bearbeitung der zum Teil mit Doppelpeaks versehenen Sequenzen wurden die PCR Amplifikate mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kit kloniert. Durch die Klonierung konnten einzelne DNA-Fragmente getrennt und im Anschluss sequenziert werden.

Bei den zu klonierenden PCR-Produkten, die älter als zwei Stunden waren und bei denen aus Agarose-Gelen gewonnenen PCR Produkten, erfolgte zuerst eine Refresh-PCR (Tab. 8) bei der Oligo-A-Überhänge angefügt wurden.

**Tab. 8:** Protokoll der Refresh PCR und Programm

#### Refresh PCR Protokoll

<u>Mix:</u> H <sub>2</sub> O	10,125 µl	<u>Cycler-Programm:</u>
10X Puffer	1,25 µl	
dNTPs (10 mM)	0,25 µl	
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µl	
Platinum Taq DNA Polymerase	0,125µl	
<u>Σ</u>	12,5 µl	

10 µL Mix + 4 µl PCR Produkt

Der Klonierungsansatz und die Transformation wurden nach Tab. 9 angesetzt und inkubiert.

Die LB-Carbenicillin-Agar-Platten und das S.O.C-Medium wurden auf Raumtemperatur gebracht. Im Anschluss wurden 40 µl X-Gal (40 mg/ml) pro Platte gleichmäßig ausplattiert. Die Zellen (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E.coli*, 50 µl) wurden auf Eis (ca. 30 min) langsam aufgetaut.

**Tab. 9:** Protokoll der Klonierungsreaktion

### Klonierungsreaktion

Ligation:

PCR-Produkt	4 µl
Salt Solution	1 µl
Vector pCR.2.1	0,5 µl
$\Sigma$	5,5 µl

bei Raumtemperatur 20min inkubieren

Für die Transformation wurde der Ligationsmix vorsichtig zu den Zellen gegeben und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen für Transformation öffnen zu können, wurde ein Hitzeschock von 42 °C über 30 Sekunden angeschlossen. Die Zellen wurden nach dem Hitzeschock sofort erneut auf Eis gegeben. Nach dem Herunterkühlen wurden 250 µl S.O.C-Medium hinzugegeben. Dieser Mix wurde für eine Stunde bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Von diesem Mix wurden ca. 100-150 µl pro Platte ausplattiert, der Rest konnte als Backup im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Kolonien, die am nächsten Tag gewachsen waren, trugen ein Plasmid mit dem Insert in sich, da nur die Bakterienzellen mit dem Plasmid und Insert die Kanamycin/Carbenicillin-Resistenz trugen auf den Platten wachsen konnten. Die nun anschließende Kolonie PCR diente der Amplifikation des im Vektor inserierten Fragmentes. Die vektorspezifischen Primer M13\_F Mod und M13\_Mod sind modifizierte Bestandteile des Kits und binden zu beiden Seiten des Inserts.

Für die Kolonie PCR wurden pro Platte ca. 10 Kolonien gewählt, die vereinzelt vorlagen und gut gepickt werden konnten. Mit einer 10 µl Pipettenspitze wurde direkt in die

Kolonie gepickt und anschließend mit einer Drehbewegung der Pipettenspitze in der Kolonie das Material in die PCR Platte mit dem vorgelegten Mix gegeben.

**Tab. 10:** Kolonie PCR Protokoll und Cyclor Programm

### Kolonie PCR Protokoll

<u>Mix:</u>		<u>Cyclor-Programm:</u>	
H <sub>2</sub> O	18,8 µl	95°C	3 min
10X PCR-Puffer	2,5 µl	95°C	30 sec
dNTPs (10 mM)	0,5 µl		
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 µl		
M13_F Mod	0,5 µl	55°C	30 sec
M13_R Mod	0,5 µl	72°C	30 sec
Platinum Taq DNA Polymerase	0,2 µl	72°C	5 min
	25 µl		
<u>Klon von Agar-Platte</u>		4°C	unendlich
$\Sigma$	25 µl		

Im Anschluss an die Kolonie PCR folgte die Aufreinigung der Probe mittels Agarose Gel und die weitere Analyse per Sequenzierung der erhaltenen Fragmente.

#### 2.2.13 DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab in Göttingen übernommen. Als Sequenzierungsoption wurde generell „Extended Hot-Shot“ gewählt. Dies beinhaltet die Sequenzierung von Plasmiden und PCR Produkten mit einer Leseweite von bis zu 1000 Basen. Für die Sequenzierung von PCR Produkten wurden 2 µl der zur Amplifikation genutzten Primer vorgelegt und mit 5 µl des aufgereinigten PCR Produkts auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt.

Die anschließende Analyse der Sequenzen erfolgte mithilfe des Programms Geneious. Die Vorbereitung für diese Analyse beinhaltete, dass zunächst die Primersequenzen oder im Falle einer Klonierung die Vektorsequenz abgeschnitten wurden. Im Anschluss wurden bei jeder Sequenz die Chromatogrammpeaks angeschaut und nicht eindeutige Peaks an beiden Enden der Sequenz eventuell entfernt. Die sauberen Sequenzen

wurden anhand ihrer Nukleotidsequenz mit den hinterlegten Sequenzen in der Online-Datenbank von NCBI (GenBank: <http://www-ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen und nach verwandten Sequenzen gesucht.

#### 2.2.14 Phylogenetische Analysen

Für die Untersuchung der phylogenetischen Verwandtschaft wurden die hier gewonnenen und für einen Stammbaum relevanten Virussequenzen untereinander und mit verwandten Sequenzen aus der Virusfamilie verglichen. Hierzu wurde aus diesen Sequenzen ein MAFFT Alignment mit Hilfe der BLOSUM62-Matrix in dem Programm ClustalW (Chenna et al. 2003) in Geneious erstellt. Die Stammbäume wurden dann basierend auf dem Alignment ebenfalls in Geneious als maximum likelihood mit Hilfe des Jukes Cantor (JC69) Substitutionsmodell und 1000 Replikaten berechnet und grafisch dargestellt. Zusätzlich wurden die Distanzen jeder Position in dem Alignment paarweise zwischen jeweils zwei Sequenzen verglichen, als statistische Methode diente dabei das *Neighbour-Joining*-Verfahren (Tamura et al. 2011, Thompson et al. 1994). Die dabei entstandenen Stammbäume geben über die Astlänge die phylogenetische Verwandtschaft der Sequenzen zueinander wieder. Je kürzer die horizontalen Linien sind, desto näher sind die Viren miteinander verwandt, während die Länge der Äste in Relation zur genetischen Distanz zunimmt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Moskitoabundanz auf dem Campusgelände in Kumasi, Ghana

Im Zeitraum von Februar bis März 2011 wurden an 26 Fangtagen mit 156 Fangeinheiten (standardisierte Fangeinheit, siehe 2.2.2.1) im Botanischen Garten und in der Wohngegend auf dem Campusgelände der Universität Kumasi (Kwame Nkrumah University Of Science and Technology, KNUST) in Kumasi, Ghana, 1.622 adulte Moskitos mit zwei unterschiedlichen Fallentypen (CDC *Light Traps* und *BG Sentinel Trap*<sup>®</sup>) und verschiedenen Lockmitteln gefangen. Im Botanischen Garten wurden 1.039 Moskitos in 89 Fangeinheiten und in dem angrenzenden Wohngebiet 583 Moskitos in 67 Fangeinheiten gefangen. Im Botanischen Garten wurden im Durchschnitt 9,54 Moskitos pro Fangeinheit gefangen und im Wohngebiet nur 5,78 Moskitos pro Fangeinheit. Damit war die Fangrate im Botanischen Garten annähernd doppelt so hoch wie in der Wohngegend.

Mit den *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup> konnten deutlich höhere Fangergebnisse erzielt werden als mit den CDC *Light Traps* (1081 Moskitos im Vergleich zu 11 Moskitos; dies entspricht einem Quotienten Moskitos/Fangeinheit von 0,82 bei den Lockmittelfallen im Vergleich zu 0,29 bei den Lichtfallen). Der Vergleich der Fangraten mit den verschiedenen Lockstoffen ergab, dass sich die Moskitos im Botanischen Garten am besten mit Käse und in der Wohngegend am besten mit getragenen Socken anlocken ließen (Tab. 11).

**Tab. 11:** Anzahl der gefangenen Moskitos mit verschiedenen Lockmitteln.

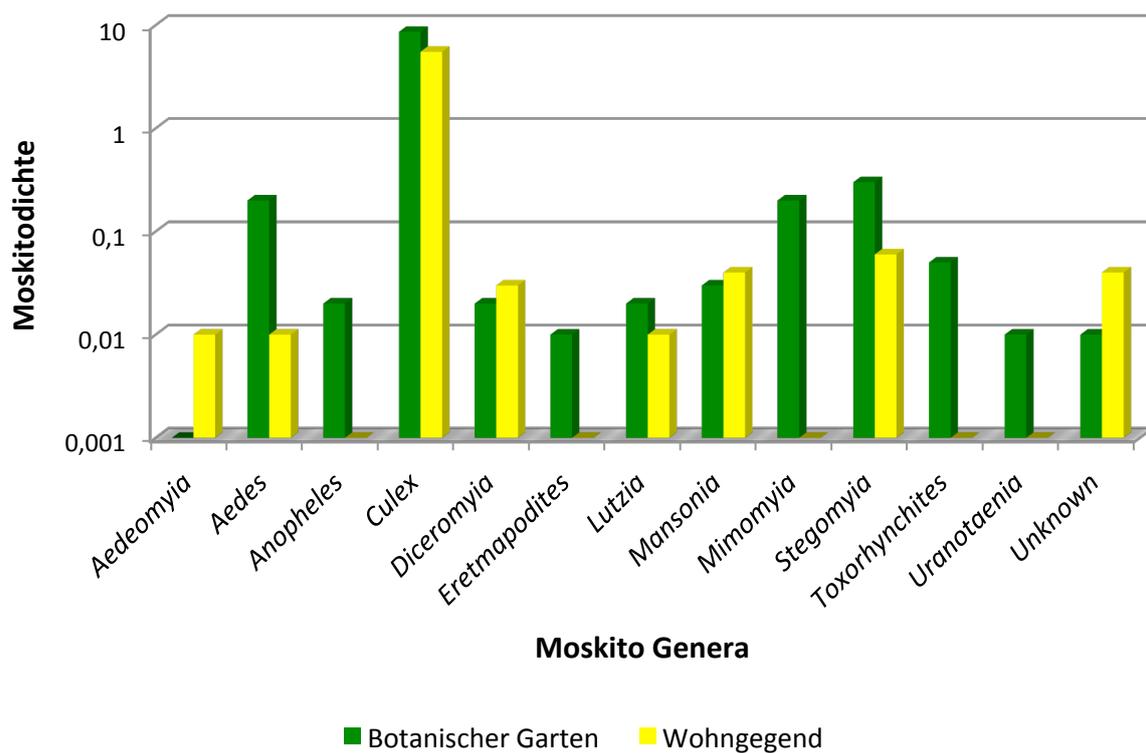
Lockmittel	Moskitos gesamt	BG <sup>1</sup>	WG <sup>2</sup>	BG <sup>1</sup> FE	Anzahl/FE <sup>3</sup>	WG <sup>2</sup> FE	Anzahl/FE <sup>3</sup>
<b>Käse</b>	750	472	278	21 FE	22,48	31 FE	8,97
<b>Wasser</b>	364	331	33	23 FE	14,39	4 FE	8,25
<b>Socke</b>	190	137	53	8 FE	17,13	5 FE	10,6
<b>T-Shirt</b>	42	15	27	2 FE	7,5	4 FE	6,75
<b>Licht</b> <sup>4</sup>	11	9	2	11 FE	0,82	7 FE	0,29
<b>Unbekannt</b>	265	75	190	24 FE		16 FE	
<b>Gesamt</b>	1622	1039	583	89 FE		67 FE	

<sup>1</sup>BG, Botanischer Garten; <sup>2</sup>WG, Wohngegend; <sup>3</sup>FE, Fangeinheit; <sup>4</sup>CDC *Light Traps*

Zum Zeitpunkt der Auswertung der Fangergebnisse lagen 59 % der Moskitos lebendig in den Fangsäckchen vor. Die übrigen 41 % der Moskitos waren bereits tot. Von den 1.622 adulten Moskitos waren 23,8 % männlich (n=386) und 76,2% (n=1236) weiblich. Von den weiblichen Moskitos wurden 849 im Botanischen Garten und 387 im Wohngebiet gefangen.

Die männlichen Moskitos wurden sechs verschiedenen Genera zugeordnet, wobei der Großteil zum Genus *Culex* gehört (*Aedes* 1 %, *Anopheles* 0,5 %, *Culex* 92,2 %, *Mansonia* 0,5 %, *Mimomyia* 5,4 %, *Uranotaenia* 0,3 %).

Die weiblichen Moskitos wurden morphologisch zu zwölf verschiedenen Genera zugeordnet und 92,4 % der Moskitos konnten bis zur Spezies bestimmt werden. 1,2 % der Moskitos konnten aufgrund des reduzierten Erhaltungszustands lediglich bis zum Subgenus und 6,1 % nur bis auf Genuslevel klassifiziert werden.



**Abb 9:** Verteilung der gefangenen Moskitos auf Genuslevel im Botanischen Garten und im Wohngebiet.

Bei vier Moskitos (0,3 %) war keine Zuordnung zu einem Genus möglich. Die Moskitos teilten sich wie folgt in die zwölf Genera auf: *Aedeomyia* <0,1 %, *Aedes* 1,5 %, *Anopheles* 0,2 %, *Culex* 92,4 %, *Diceromyia* 0,3 %, *Eretmapodites* <0,1 %, *Lutzia* 0,2 %, *Mansonia* 0,5 %, *Mimomyia* 1,5 %, *Stegomyia* 2,4 %, *Toxorhynchites* 0,4 %, *Unknown* 0,3 %, *Uranotaemia* <0,1 % (Abb. 9).

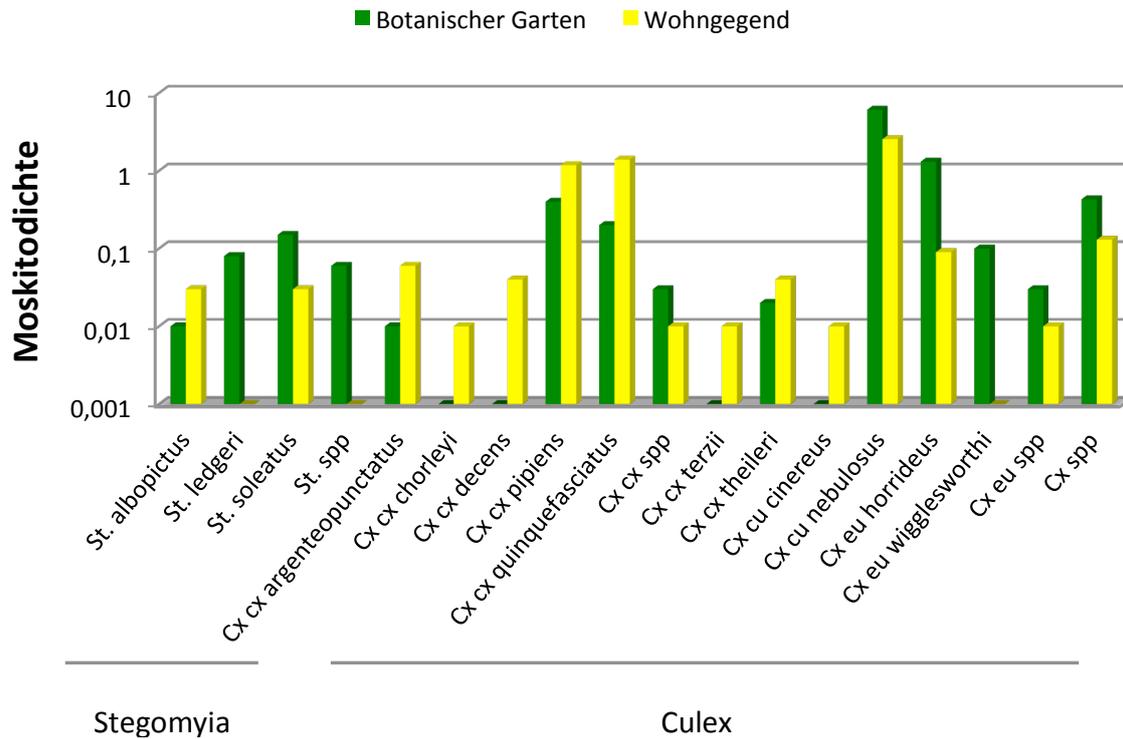
Im Botanischen Garten wurden elf verschiedene Genera und im Wohngebiet sieben verschiedene Genera gefangen. Der Großteil der Proben gehörte an beiden Fangorten zum Genus *Culex* (92,4 %). Moskitos der fünf Genera *Anopheles*, *Eretmapodites*, *Mimomyia*, *Toxorhynchites* und *Uranotaenia* wurden nur im Botanischen Garten und Moskitos des Genus *Aedomyia* nur in der Wohngegend gefangen. Diese Daten lassen eine höhere Diversität im Botanischen Garten und eine hohe Habitatspezifität einzelner Moskitospezies vermuten.

**Tab. 12:** Anzahl gefangener weiblicher Moskitospezies in absoluten Werten (n) und in relativen Verhältnissen zu Fangeinheit (M/FE) aufgeteilt nach Fangort.

Moskito	Gesamt		Botanischer Garten		Wohngegend	
	n	%	n	M/FE	n	M/FE
<i>Aedeomyia lepiothauma africana</i>	1	< 0,1%	-	-	1	0,01
<i>Aedes</i> spp	19	1,5	18	0,2	1	0,01
<i>Anopheles neocellia salbaii</i>	2	0,2	2	0,02	-	-
<i>Culex culex argenteopunctatus</i>	5	0,4	1	0,01	4	0,06
<i>Culex culex chorleyi</i>	1	< 0,1%	-	-	1	0,01
<i>Culex culex decens</i>	3	0,2	-	-	3	0,04
<i>Culex culex pipiens</i>	115	9,3	36	0,4	79	1,18
<i>Culex culex quinquefasciatus</i>	111	9	18	0,2	93	1,39
<i>Culex culex</i> spp	4	0,3	3	0,03	1	0,01
<i>Culex culex terzii</i>	1	< 0,1%	-	-	1	0,01
<i>Culex culex theileri</i>	5	0,4	2	0,02	3	0,04
<i>Culex culiciomyia cinereus</i>	1	< 0,1%	-	-	1	0,01
<i>Culex culiciomyia nebulosus</i>	713	57,7	542	6,09	171	2,55
<i>Culex eumelanomyia horrideus</i>	123	10	117	1,31	6	0,09
<i>Culex eumelanomyia wigglesworthi</i>	9	0,7	9	0,1	-	-
<i>Culex eumelanomyia</i> spp	4	0,3	3	0,03	1	0,01

<i>Culex</i> spp	47	3,8	38	0,43	9	0,13
<i>Diceromyia fascipalpis</i>	4	0,3	2	0,02	2	0,03
<i>Eretmapodites silvestris</i>	1	< 0,1%	1	0,01	-	-
<i>Lutzia</i> spp	3	0,2	2	0,02	1	0,01
<i>Mansonia</i> spp	3	0,2	3	0,03	-	-
<i>Mansonia africana</i>	2	0,2	-	-	2	0,03
<i>Mansonia theobaldi africana</i>	1	< 0,1%	-	-	1	0,01
<i>Mimomyia pallida</i>	18	1,5	18	0,2	-	-
<i>Stegomyia albopictus</i>	3	0,2	1	0,01	2	0,03
<i>Stegomyia ledgeri</i>	7	0,6	7	0,08	-	-
<i>Stegomyia soleatus</i>	15	1,2	13	0,15	2	0,03
<i>Stegomyia</i> spp	5	0,4	5	0,06	-	-
<i>Toxorhynchites brevipalpis</i>	2	0,2	2	0,02	-	-
<i>Toxorhynchites</i> spp	3	0,3	3	0,03	-	-
Unknown	4	0,3	1	0,01	3	0,04
<i>Uranotaenia pseudoficalbia</i> spp	1	< 0,1%	1	0,01	-	-

Im Botanischen Garten wurden 15 Spezies zugehörig zu 11 Genera und in der Wohngegend 16 Spezies zugehörig zu sieben Genera identifiziert (Tab. 12). Die größte Diversität lag innerhalb der Gattung *Culex* mit sieben unterschiedlichen Arten im Botanischen Garten und mit 10 verschiedenen Arten in der Wohngegend (Abb. 12). Die Anzahl an gefangenen *Culex* Moskitos ist im Botanischen Garten höher als im Wohngebiet (8,62 im Vergleich zu 5,53 Moskitos/Fangeinheit). Im Wohngebiet wurden vier Spezies gefangen, die im Botanischen Garten nicht gefangen werden konnten: *Cx. cx. choleyi*, *Cx. cx. decens*, *Cx. cx. terzii* und *Cx. culiciomyia cinereus*. Die Spezies *Cx. eumelanomia wigglesworthi* wurde nur im Botanischen Garten gefangen. Das am zweithäufigst vertretene Genus war das Genus *Stegomyia* mit 2,4 %.



**Abb. 10:** Abundanz gefangener *Stegomyia* und *Culex* Arten gezeigt für beide Fangorte.

Insgesamt zeigten sich Unterschiede im Vorkommen der Moskitoarten an den beiden Fangorten. In der Wohngegend zeigte sich, gegen die erste Vermutung, eine höhere Diversität, wie auch eine höhere Gleichmäßigkeit der Individuenanzahl, welches sich anhand verschiedener mathematischer Größen in Bezug zu den Fangorten berechnen lässt. Die Diversität lässt sich anhand des Shannon oder Simpson Index berechnen. Der Shannon Index beschreibt die Artenvielfalt innerhalb einer Gruppe von Arten. Im Botanischen Garten liegt er mit 1,104 niedriger als im Vergleich zu 1,418 in der Wohngegend. Je kleiner die Zahl desto gleichmäßiger sind die Moskitoarten vertreten. Eine weitere Berechnung der Diversität ist durch den Simpson Index möglich. Hiermit errechnet sich die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen in einem Fang nicht derselben Spezies angehören. Eine Berechnung  $D = 0$  bedeutet: alle gefangenen Individuen gehören einer Spezies an. Je mehr sich  $D$  1 annähert desto größer ist die Diversität. In dieser Arbeit zeigt sich hier eine geringere Diversität im Botanischen Garten mit 0,479 im Vergleich zu der Wohnunggegend mit 0,68.

Die Gleichmäßigkeit der vorhandenen Spezies kann anhand der Äquität errechnet werden. Je höher die Äquität, desto ausgeglichener ist die Individuenzahl. Hier zeigt sich eine ausgeglichene Verteilung in der Wohngegend mit einer Äquität von 0,511 im Vergleich zu 0,407 im Botanischen Garten (siehe Tab. 13).

**Tab. 13:** Berechnung der Diversität an den beiden Fangorten anhand verschiedener mathematischer Größen

	Gesamt	Botanischer Garten	Wohngegend
Fangeinheit	156	89	67
Spezies Richness	22	15	16
Diversität (Shannon)	1,352	1,104	1,418
Diversität (Simpson)	0,579	0,479	0,68
Äquität (Evenness)	0,437	0,407	0,511

### 3.2 PCR Screening der gepoolten Moskitos

Alle gefangenen Moskitos wurden auf Infektionen mit Arboviren untersucht und hierzu in 62 Moskitopools zusammengefasst. Diese wurden mit beschriebenen, generischen PCR-Systemen auf Infektionen mit Viren der Genera *Pegivirus* (unpubliziert), *Flavivirus* (Moureau et al. 2007), *Alphavirus* (Grywna et al. 2010), *Alphamesonivirus* (Zirkel et al. 2013), *Orthobunyavirus* (Marklewitz et al. 2013) und *Phlebovirus* (unpubliziert) inklusive verwandter insektenspezifischer Viren getestet. Bei positiven Ergebnissen wurden in besonderen Fällen alle einzelnen Moskitos des zugehörigen Pools getestet, um die infizierte Moskitoart und Virusprävalenz bestimmen zu können.

#### 3.2.1 Untersuchung auf Pegiviren

Eine dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese war, ob Pegiviren zwischen Palmenflughunden (*Eidolon helvum*) durch Moskitos übertragen werden können. In dieser Arbeit wurden die Moskitos in unmittelbarer Nähe zu den Flughunden im Botanischen Garten von Kumasi gefangen und mittels zweier unterschiedlichen PCR-Assays auf Pegiviren getestet.

Sowohl eine Onestep PCR mit anschließender nested PCR, als auch eine Real-Time PCR (Epstein et al. 2010), die spezifisch für die in den Palmenflughunden nachgewiesenen Pegiviren ist, lieferten keinen Hinweis auf eine Infektion der Moskitos mit Pegiviren.

### 3.2.2 Untersuchung auf Alphaviren und Mesoniviren

In den 62 Moskitopools konnten keine Infektionen mit Alpha- und Mesoniviren nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Untersuchung auf Flaviviren

Bei 22 von 62 (35,5%) Moskitopools wurden Flaviviren dedektiert. Die Sequenzen ließen sich in drei verschiedene Gruppen (Contigs) einteilen. Vergleiche mit der NCBI Datenbank zeigten für ein Contig (n = 17 positive Pools) eine enge Verwandtschaft zu *Culex flavivirus* (ca. 98 % Identität auf nt-Ebene). Somit handelt es sich um 17 neue Stämme des *Culex flavivirus*, wobei die Identität der verschiedenen Sequenzen der 17 positiven Pools zwischen 96 und 98 % auf nt-Ebene lag.

Für die beiden anderen Contigs zeigte sich bei BLAST nur eine geringe Verwandtschaft mit ca. 60 % Identität zu insektenspezifischen Flaviviren (ISF). Dies lässt vermuten, dass höchstwahrscheinlich zwei bisher unbekannte Spezies entdeckt wurden. Im weiteren Verlauf werden diese beiden Viren als Kumasi-ISF-A und Kumasi-ISF-B bezeichnet (Tab. 14). Kumasi-ISF-A besteht aus einem positiven Pool, Kumasi-ISF-B aus vier positiven Pools. Die vier Stämme von Kumasi-ISF-B zeigten eine 73 – 76 % nt-Identität zueinander.

Phylogenetische Analysen mit den hier identifizierten Flavivirussequenzen und bekannten Flaviviren zeigten, dass die neuen Flaviviren drei Kladen bilden (Abb. 11). Bei dem Contig mit 17 positiven Pools zeigten die Sequenzen mittels BLAST Vergleich eine hohe Ähnlichkeit zu *Culex flavivirus* und gruppieren sich mit anderen *Culex flavivirus* Stämmen. Sie zeigen eine 98 % ige Identität zu den bekannten *Culex flaviviren*, sodass es sich um 17 neue Stämme des *Culex flavivirus* handelt. *Culex flavivirus* wurde in Moskitos aus Asien, Amerika und Ostafrika nachgewiesen. Die hier gefundenen Stämme sind die ersten aus Westafrika.

Kumasi-ISF-A gruppiert mit insektenspezifischen Flaviviren, die aus *Aedes* Moskitos stammen. Das Virus Kumasi-ISF-A wurde aus einem Pool extrahiert welcher sich ausschließlich aus *Aedes*-Arten zusammensetzt. Beim Vergleich der Sequenz in der Genbank unter Verwendung von BLAST zeigte Kumasi-ISF-A eine 79% igen Übereinstimmung zu dem Cell fusing agent Virus (CFAV). CFAV ist ein klassisches ISF,

sodass auch beim Kumasi-ISF-A davon ausgegangen werden kann, dass es einen rein insektenspezifischen Phänotyp hat.

**Tab. 14:** In dieser Arbeit identifizierte Flaviviren.

Virus	Stamm	Moskitospezies	Herkunft
Kumasi-ISF-A	P01-GH2011	<i>Ae. le. africana, Ae. di. fascipalpis, Ae. spp.</i>	BG/WG
Kumasi-ISF-B	P02-GH2011	<i>Ae. Spp., St. albopictus, St. ledgeri, St. soleatus</i>	BG/WG
	P03-GH2011	<i>St. soleatus, St. spp., An. neo. salbaii, Ma. africana, Ma. Spp., Ma. theobaldi</i>	BG/WG
Culex flavivirus	P04-GH2011	<i>Cx. argenteopunctatus, Cx. chorleyi, Cx. decens, Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P58-GH2011	<i>Ma. spp., Cx. spp., St. ledgeri, Cx. pipiens, Lu. spp., Er. silvestris, Cx. eu. wigglesworthi, Cx. eu. spp.</i>	BG/WG
	P05-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P06-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P07-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P08-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P09-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P10-GH2011	<i>Cx. pipiens, Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P11-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P12-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P13-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P14-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P15-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus, Cx. Spp., Cx. terzii, Cx. theileri, Cu. cinereus, Cu. nebulosus</i>	BG/WG
	P24-GH2011	<i>Cu. nebulosus</i>	BG/WG
	P28-GH2011	<i>Cu. nebulosus, Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P50-GH2011	<i>Cu. nebulosus</i>	BG/WG
P57-GH2011	<i>Cx. eu. horrideus, Cx. Spp., Cx. pipiens</i>	BG	
P59-GH2011	<i>Cx. spp.</i>	BG/WG	
P60-GH2011	<i>Cx. spp.</i>	BG/WG	

Kumasi-ISF-B gruppiert mit anderen insektenspezifischen Flaviviren, die ebenfalls aus *Aedes* Moskitos stammen. Es zeigt zum Menghai Flavivirus (MFV), einem Flavivirus

welches bei einem Arbovirus-Screening in China entdeckt wurde (Zhang et al. 2017), eine lediglich 76% ige Ähnlichkeit. Phylogenetisch liegt es somit nahe, dass Kumasi-ISF-B eine neuartige Spezies innerhalb der insektenspezifischen Flaviviren darstellt. Die Pools in denen Kumasi-ISF-B nachgewiesen wurde, waren gemischte Moskito Pools, die *Aedes*-, *Stegomyia*-, *Mansonia*- und *Culex*-Arten beinhalten (Tab. 14).

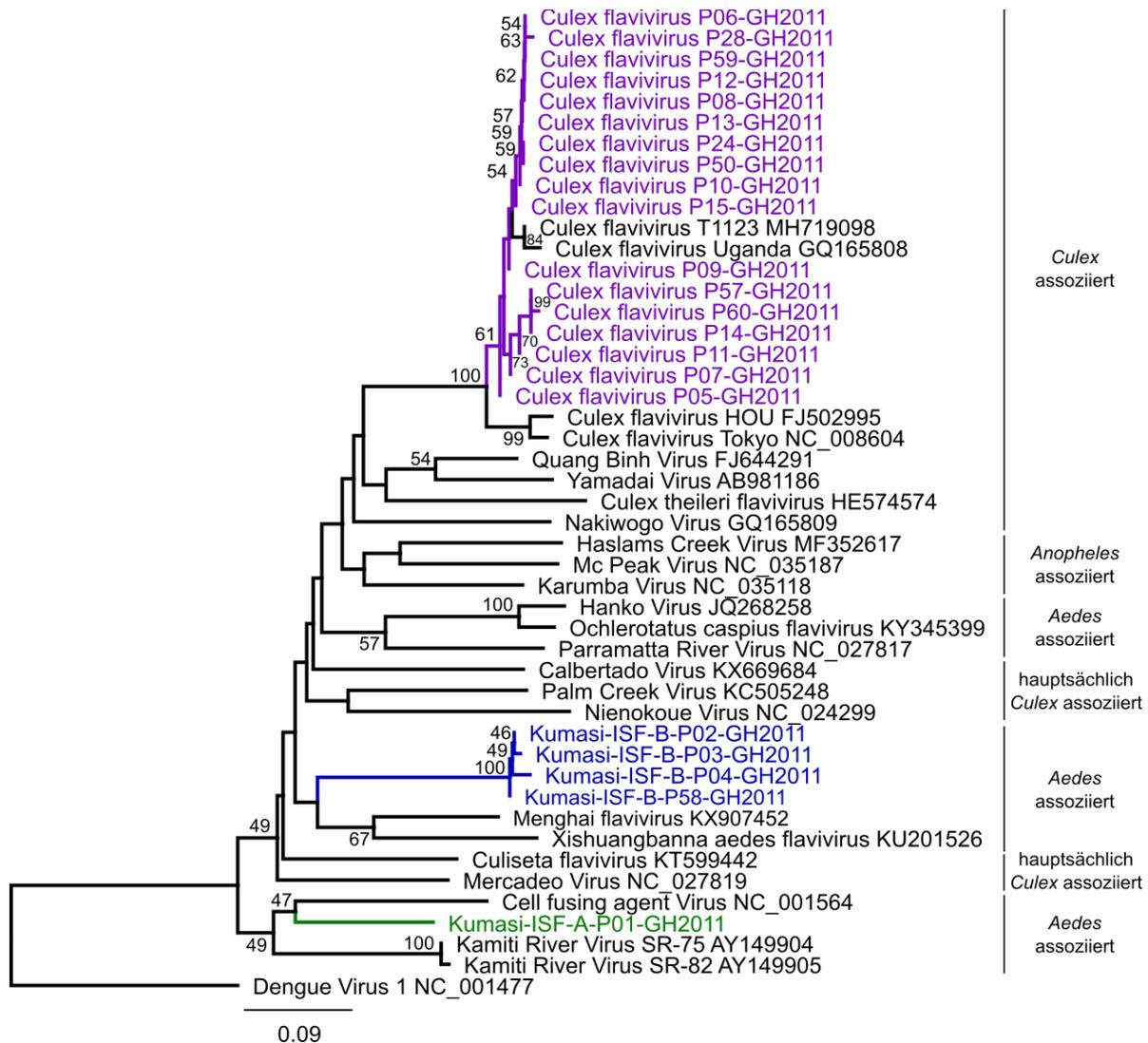
Die Sequenzauswertung zeigte, dass ca. die Hälfte der Sequenzen an bestimmten Positionen nicht eindeutig war und sogenannte Doppelpeaks aufwiesen. Dies deutet auf auf eine Mischinfektion mit mehreren Virusvarianten hin. Auffällig war, dass die Doppelpeaks bei *Culex flavivirus* häufig an gleichen Genompositionen in unterschiedlichen Proben zu finden waren, wie z.B. bei Stamm P09-GH2011 an den Positionen 13 (C und T), 52 (C und T), 64 (A und G), 73 (C und T), 88 (A und C), 100 (G und T), 121 (A und C), 142 (G und C), 154 (C und T), sowie 157 (A und G).

**Tab. 15:** Sequenzen mit Doppelpeaks. Die fett markierten Positionen kommen bei min. 50% der Stämme vor.

Pool	Basenposition der Doppelpeaks
P02	44 (T+G), 55 (A+G), 82 (C+T), 113 (A+T), 136 (A+G)
P05	<b>13 (C+T)</b> , 31 (C+T), <b>52 (C+T)</b> , <b>73 (C+T)</b> , <b>88 (A+C)</b> , <b>121 (A+C)</b> , <b>142 (G+C)</b> , <b>154 (C+T)</b> , <b>157 (A+G)</b>
P07	<b>13 (C+T)</b> , <b>73 (C+T)</b> , <b>88 (A+C)</b> , <b>121 (A+C)</b> , <b>142 (G+C)</b> , <b>154 (C+T)</b>
P08	22 (C+T), <b>52 (C+T)</b>
P09	<b>13 (C+T)</b> , <b>52 (C+T)</b> , 64 (A+G), <b>73 (C+T)</b> , <b>88 (A+C)</b> , 100 (G+T), <b>121 (A+C)</b> , <b>142 (G+C)</b> , <b>154 (C+T)</b> , <b>157 (A+G)</b>
P10	<b>13 (C+T)</b> , <b>52 (C+T)</b> , 64 (A+G), <b>73 (C+T)</b> , <b>88 (A+C)</b> , 100 (G+T), <b>121 (A+C)</b> , <b>142 (G+C)</b> , <b>154 (C+T)</b> , <b>157 (A+G)</b>
P11	<b>13 (C+T)</b> , <b>52 (C+T)</b> , <b>73 (C+T)</b> , <b>88 (A+C)</b> , <b>121 (A+C)</b> , <b>142 (G+C)</b> , <b>154 (C+T)</b> , <b>157 (A+G)</b>
P12	22 (C+T), <b>52 (C+T)</b>
P13	<b>13 (C+T)</b> , <b>52 (C+T)</b> , <b>88 (A+C)</b> , 100 (G+T), 130 (C+T), <b>142 (G+C)</b> , <b>154 (C+T)</b> , <b>157 (A+G)</b>
P15	<b>13 (C+T)</b> , <b>52 (C+T)</b> , <b>73 (C+T)</b> , <b>88 (A+C)</b> , 100 (G+T), <b>121 (A+C)</b> , <b>142 (G+C)</b> , <b>154 (C+T)</b> , <b>157 (A+G)</b>
P59	<b>73 (C+T)</b>

Bei Kumasi-ISF-B (P02-GH2011) wurden die Doppelpeaks an anderen Genompositoinen nachgewiesen, z.B. 44 (T und G), 55 (G und A), 82 (C und T), 113 (A und T) sowie 136 (A und G). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass mehrere Moskitos innerhalb der Pools mit verschiedenen Virusvarianten infiziert waren. Exemplarisch wurde für diese Fragestellung der Pool 2 kloniert. Hier zeigten sich

saubere Sequenzen für beide Varianten, so dass von einer Infektion mit zwei unterschiedlichen Virusvarianten ausgegangen werden kann.



**Abb. 11:** Phylogenetische Analyse der in dieser Studie gefundenen Flaviviren zu etablierten insekten-spezifischen Flaviviren mittels eines maximum likelihood Stammbaum. Zunächst wurde ein Nukleotidalignment mit Hilfe des MAFFT Programms erstellt. Es erfolgte eine maximum likelihood Analyse (engl. *phylogenetic inferences using Maximum Likelihood*, PHYML) mit dem Jukes Cantor 69 Substitutionsmodell und 1000 bootstrap Replikaten. Als Außengruppe diente DENV. Neu beschriebene Viren sind farblich dargestellt. Repräsentative Vertreter der insekten-spezifischen Flaviviren sind in schwarz aufgeführt.

Auffällig war, dass die Sequenzen der Viren Kumasi-ISF-A und Kumasi-ISF-B keinen durchgehenden offenen Leserahmen (open reading frame (ORF)) aufwiesen und damit

kein für Flaviviren typisches Polyprotein bilden können. Die Integration von flaviviralen Genomfragmenten ins Genom der Wirtszelle wurde beschrieben (Crochu et al. 2004). Der ORF von integrierten viralen Genomfragmenten ist in der Regel durch Stopcodons unterbrochen und es können keine funktionalen Proteine exprimiert werden. Es ist daher naheliegend, dass die detektierten Sequenzen der Viren Kumasi-ISF-A und Kumasi-ISF-B ins Genom der Moskitos integriert sind.

Für die phylogenetische Analyse wurde ein Alignment auf Nukleotidebene erstellt. Dieses zeigte schlussendlich jedoch nur eine sehr kurze Sequenz von insgesamt 162 nt welches die niedrigen Bootstrap-Werte erklären kann. Jedoch lässt sich anhand dieser Sequenzen bereits eine Übersicht über die Einordnung der neuen Viren erkennen, welches sich wie erwartet innerhalb der cISF einordnen.

#### 3.2.4 Untersuchung auf Bunyaviren

Bei der Untersuchung der Moskitos auf Infektionen mit Viren der Ordnung *Bunyvirales* wurde der Fokus auf die Genera *Phlebovirus* und *Goukavirus* der Familie *Phenuiviridae* und die Genera *Orthobunyavirus* und *Herbevirus* der Familie *Peribunyaviridae* gelegt.

Die Moskitopools wurden mittels zwei verschiedener PCR-Systeme getestet, die zum einen Phleboviren und die Diversität um das neu beschriebene Gouleako Virus detektieren und zum anderen Orthobunyaviren und Herbert Virus ähnliche Viren erfassen. Gouleako Virus und Herbert Virus sind entfernt zu den Genera *Phlebovirus* und *Orthobunyavirus* verwandt und sind die Prototypen zwei neuer Genera (Marklewitz et al. 2011 und 2013, ICTV 2018).

##### 3.2.4.1 Screening auf Phenuiviren

Bei 25 Pools wurden Genomfragmente von Viren mit Ähnlichkeit zu Viren des Genus *Phasivirus* detektiert. Die Sequenzen gruppieren in zwei Contigs, die innerhalb der Contigs 97-100 % Ähnlichkeit auf nt-Ebene untereinander aufwiesen. Diese hohe Ähnlichkeit lässt vermuten, dass verschiedene Stämme, die unterschiedlichen Virusspezies angehören, detektiert wurden. Die Sequenzen der zwei Contigs hatten zueinander mindestens eine genetische Distanz von 65 % und zeigten beim Vergleich mit Sequenzen in der NCBI Datenbank mittels BLASTn keine nahe Verwandtschaft zu bekannten Phleboviren. Damit gehören die Virussequenzen höchstwahrscheinlich zu

zwei bisher unbekannten Viren und werden nachfolgend als KNUST-Aedes Virus und KNUST-Culex Virus bezeichnet.

**Tab. 16:** Detektierte neuartige Phenuiviren

Virus	Stamm	Moskitospezies	Herkunft
KNUST-Aedes Virus	P02-GH2011	<i>Ae. spp.</i> , <i>St. albopuctus</i> , <i>St. ledgeri</i> , <i>St. soleatus</i>	BG/WG
	P03-GH2011	<i>St. soleatus</i> , <i>St. spp.</i> , <i>An. neo. salbaii</i> , <i>Ma. africana</i> , <i>Ma. Spp.</i> , <i>Ma. theobaldi</i>	BG/WG
KNUST-Culex Virus	P01-GH2011	<i>Ae. le. africana</i> , <i>Ae. di. fascipalpis</i> , <i>Ae. spp.</i>	BG/WG
	P04-GH2011	<i>Cx. argenteopunctatus</i> , <i>Cx. chorleyi</i> , <i>Cx. decens</i> , <i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P05-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P06-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P07-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P08-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P09-GH2011	<i>Cx. pipiens</i>	BG/WG
	P10-GH2011	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P11-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P12-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P13-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P14-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P15-GH2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Cx. spp.</i> , <i>Cx. terzij</i> , <i>Cx. theileri</i> , <i>Cu. cinereus</i> , <i>Cu. nebulosus</i>	BG/WG
	P17-GH2011	<i>Cx. nebulosus</i>	BG/WG
	P24-GH2011	<i>Cu. nebulosus</i>	BG/WG
	P28-GH2011	<i>Cu. nebulosus</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG/WG
	P50-GH2011	<i>Cu. nebulosus</i>	BG/WG
	P54-GH2011	<i>Cx. horrideus</i> , <i>Cu. wigglesworthii</i>	BG/WG
P55-GH2011	<i>Cx. horrideus</i>	BG/WG	
P56-GH2011	<i>Cx. horrideus</i>	BG	
P57-GH2011	<i>Cx. eu. horrideus</i> , <i>Cx. spp.</i> , <i>Cx. pipiens</i>	BG/WG	

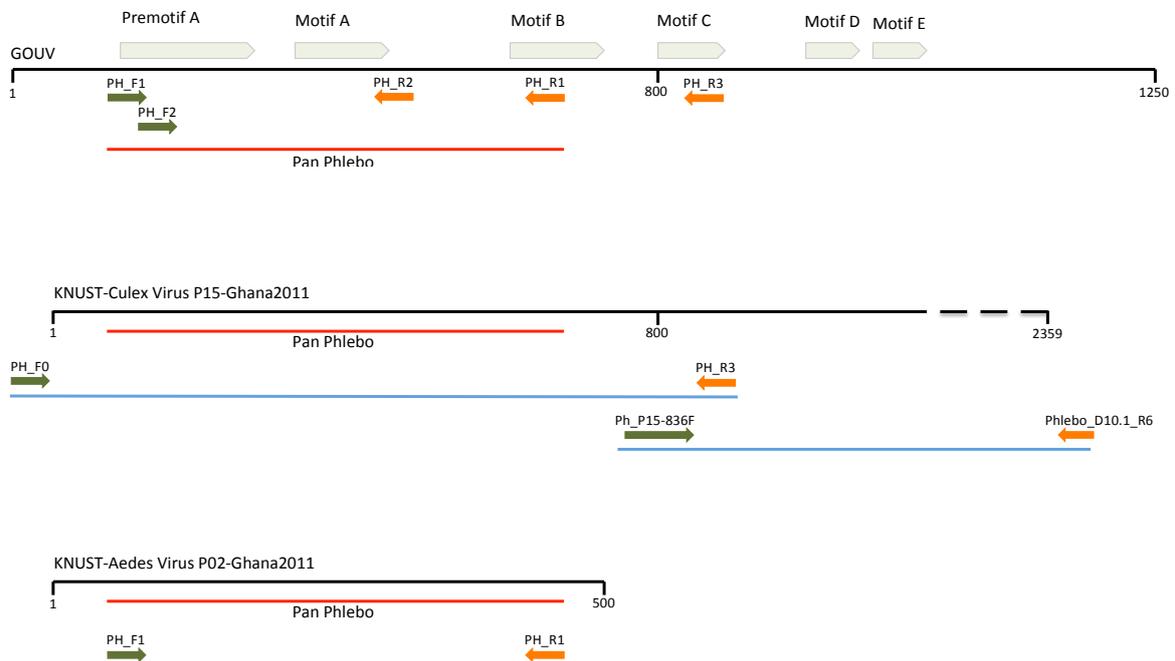
P58-GH2011	<i>Unknown, Ma. spp., Cx. spp., St. ledgeri, Cx. pipiens, Er. silvestris, Cx. spp., Cx. wigglesworthii, Cx. spp., Lut. Spp</i>	BG/WG
P59-GH2011	<i>Cx. spp.</i>	BG/WG

KNUST-Aedes Virus wurde nur in zwei Pools gefunden, welche hauptsächlich aus *Aedes* Moskitos zusammengesetzt waren. Die Virussequenzen zeigten zueinander eine 99 %ige Übereinstimmung. KNUST-Aedes Virus weist damit eine Prävalenz von 3,2 % (2/62) auf. KNUST-Culex Virus wurde mit einer Prävalenz von 37,1 % (23/62) gefunden und hauptsächlich in den Moskitopools, die aus *Culex* Moskitos bestanden, nachgewiesen (Tab. 16).

Um die beiden neuartigen Viren taxonomisch und phylogentisch besser einordnen zu können, wurde als nächstes versucht, die gesamte Länge der hoch konservierten Polymerasemotive zu sequenzieren. Hierzu wurden basierend auf der vorhandenen Sequenzinformation für beide Viren spezifische Primer designt mit denen die vorhandene Sequenz in 5'- und in 3'-Richtung verlängert werden sollte. Für die PCR Reaktionen wurden für KNUST-Aedes Virus repräsentativ die Stämme P02-GH2011 und P03-GH2011 und für KNUST-Culex Virus entsprechend die Stämme P15-GH2011 und P17-GH2011 verwendet.

Die Sequenzinformation des KNUST-Culex Virus P15-GH2011 konnte mit den Primern Ph-F0 und Ph-R3 von 473 nt auf 880 nt in 5' Richtung verlängert werden. In einem zweiten Verlängerungsschritt konnte mit einem spezifischen und einem sub-spezifischen Primer (Ph\_P15-836F und Phlebo\_D10.1\_R6) die Sequenz auf insgesamt 2,359 nt verlängert werden und deckt damit den gesamten Bereich der konservierten Polymerasemotive ab (Abb. 12). Bei KNUST-Culex Virus P17-GH2011 konnte die Sequenz lediglich auf 655 nt mit den Primern Ph-P17-59F und Ph-P15-877R verlängert werden. Alle weiteren Amplifikationsversuche schlugen fehl.

Alle Versuche die vorhandene Sequenzinformation des KNUST-Aedes Virus zu verlängern waren erfolglos. Versuche mit verschiedenen Primerkombinationen mit spezifischen und generischen Primern, sowie mit random und spezifischen Primern hergestellte cDNA führten zu keinem positiven Ergebnis. Von KNUST-Aedes Virus liegen nur Sequenzfragmente von 475 nt vor, welches lediglich einen Teil des Prämotif A bis zu dem 5' terminalen Bereich von Motif B abdeckt.



**Abb. 12:** Schematische Darstellung der PCR-Varianten zur Sequenzierung der phleboähnlichen Viren KNUST-Aedes Virus und KNUST-Culex Virus. Zur Orientierung ist die dritte konservierte Region des L-Segments von GOLV mit den sechs hochkonservierten Motifen (hellgrau) dargestellt, sowie die bisherigen Fragmente von P15-GH2011 und P02-GH2011. Rote Striche kennzeichnen den Pan-Phlebo amplifizierte Bereich. Blaue Striche kennzeichnen die Verlängerung. Grüne Pfeile stellen Forward-Primer dar, orange Reverse-Primer.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen innerhalb der konservierten Motive Prämotif A bis Motiv E zwischen KNUST-Aedes Virus, KNUST-Culex Virus, Gouléako Virus und repräsentativen Vertretern aller etablierten Bunyavirusgenera zeigte, dass die hier erstmals identifizierten Viren ebenfalls die hochkonservierten Aminosäuren besitzen (Abb. 13).

Group	Virus	Premotif A	Motif A	Motif B
N	DUGV	KAQLGG-SRDLLVQETGTKVIHATTEMFGR	FFKTVCISGDNTK-WGPIHC	MNSYNHMQGLIHHATSS
	CCHV	KAQLGG-ARDLLVQETGTKVMHATTEMFGR	FYKVICISGDNTK-WGPIHC	LNSYNHMQGLIHHATSSVLTSV
H	HANV	KYQRTQADRGFFITTLPTRCRLEIIEDEYD	KRKLMYVSADATK-WSPGDN	GEVTKGNWLQGNLNKCSSLFGVA
	TPMV	KHQRTEADRGFFITTLPTRVRLIIEDEYD	KRKLMYVSADATK-WSPGDN	GLVVRGNWLQGNLNKCSSLFSVA
T	TSWV	KMORTKTDRREIYLMGAEERIVQSVVETIAR	KSRLAFLSADQSK-WASADL	YPVSMNWLQGNLNKCSSLFGVA
	WSMV	KMORTKMDREIYLMGAEERIVQSVVETIAR	ECKMAFLSADQSK-WASADL	FPVSMNWLQGNLNKCSSLFGVA
O	BUNV	KGQKTAKDREIFVGEFEAKMCMYVVERISK	ALKLE-INADMSK-WAQDV	VQIKRNWLQGNFNKCSSLFGVA
	GROV	KGQKTFKDRREIFVGFETKCMYVVERIAK	SLKLE-INADMSK-WAQDM	IQIRMNWLQGNFNKCSSLFGVA
P	RVFV	KQOHGG-LREIYVMGAEERIVQSVVETIAR	PVWTCATSDARK-WNQGHF	LETTTGMQGLIHYTSSLLHTI
	SFNV	KQOHGG-LREIYVMGAEERIVQSVVETIAR	SVWTCATSDARK-WNQGHY	LKTSTGMQGLIHYTSSLLHSL
	UUKV	KQOHGG-LREIYVMGAEERIVQSVVETIAR	HHEVATSDAAK-WNQCHH	VQTETGMQGLIHYTSSLLHTL
	SFTSV	KQOHGG-LREIYMDANARLVQFVETMAR	GSININSDAAK-WNQGHY	IKTETGMQGLIHYTSSLLHSC
GouV	GOUV	KQOHGG-LREIYVLDLASEIVQLCLEEISR	YKSNVSSDA-KVWNOGHH	MRIESGMQGLIHYTSSLPHAS
	KCV15	KQOHGG-LREIYVGLGFEEVVRQRIIEQLAR	SHITLNSADASK-WSONNC	IELTTGMQGLIHYSSLYHSA
	KAV02	-----DREIYVGLGFEEVVRQLIEQLAR	GHLTFNSADASK-WSONNS	IEVT-----

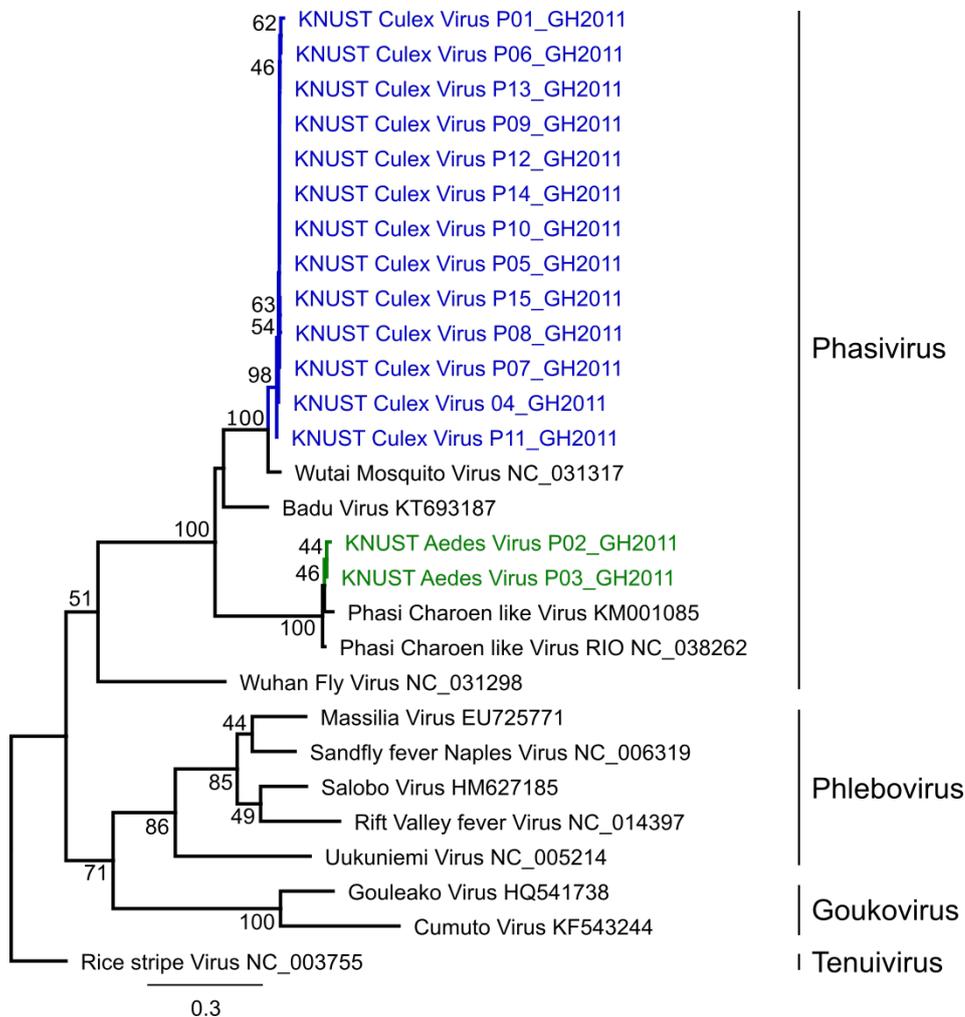
  

Group	Virus	Motif C	Motif D	Motif E
N	DUGV	TVNVDHAGSSDDYAK	VRRCCQM--KDSAK	FLEBYSEEMMGN
	CCHV	TVHVEHAGSSDDYAK	VQRCCQM--KDSAK	FLEBYSEEMMGY
H	HANV	DCFFFEFAHSSDDALF	GSIKISPK-KTIVS	NABELSTFEFC
	TPMV	DCFIEFAHSSDDALF	GSVKVSPK-KTIVS	NABELSTFEFC
T	TSWV	DFQTRWVHSSDDNAT	FCITLNP-KSYAS	EVEBISERIVNG
	WSMV	DFTIRWVHSSDDNAT	YCITLNP-KSYAS	EVEBISERIIING
O	BUNV	DCLINSMVHSSDDNQT	FGCQANMK-KFYIT	CKEYVSLNLHG
	GROV	HANATSMVHSSDDNQT	FGCQANMK-KTYLT	IKBYVSLNLHG
P	UUKV	DVLVDVLOSDDSGM	YLGIISSV-KSTNN	LLEBNSSEFFHI
	RVFV	SLVCDMMQGSDDSSM	YLAIYPS-EKSTAN	VMEYNSSEFFHT
	SFNV	KVVCDMMQGSDDSSM	YIGIYPS-EKSTPN	VMEYNSSEFFHS
	SFTSV	SGVVDVIEGSDDSAI	LFGIYSS-EKSTVN	CVEYNSSEHFHR
GouV	GOUV	SITTDLV-SDDSSR	CFGWVMSPKSTYC	IMEBNSSEYFFRA
	KCV15	KIVMCHLOSDDSFF	AMGVVNSEVKSALA	VFEBNSSEFFGF
	KAV02	-----	-----	-----

**Abb. 13:** Alignment der Motive in der dritten konservierten Region der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Premotif A, Motif A, B, C, D, E) und den KNUST-Culex Virus P15-GH2011 (KCV15) und KNUST-Aedes Virus P02-GH2011 (KAV02) und Vertretern der Bunyavirus Genera (N = Nairovirus, H = Hantavirus, T = Tospovirus, O = Orthobunyavirus, P = Phlebovirus, GOLV = Gouleakovirus). Regionen mit Homologien zu aktiven Zentren (3'vRNA Bindestelle, Nukleotid-Additions-Stelle) sind umrahmt. Aminosäuren mit 100 % Übereinstimmung wurden schwarz hinterlegt, mit >75 % dunkelgrau und >50 % hellgrau.

Die oben beschriebenen PCR-Produkte wurden sequenziert und ein Vergleich der Nukleotidsequenzen mit der Online Datenbank NCBI zeigte für KNUST-Culex Virus eine 94 % ige Übereinstimmung zum Wutai Virus, einem *Phasivirus* aus der Familie *Phenuiviridae*. Für KNUST-Aedes Virus zeigte sich im Vergleich der NCBI Datenbank eine hohe Ähnlichkeit mit 98 % zum Phasi Charoen-like Virus, ebenfalls ein *Phasivirus*.

Sowohl Wutai Virus wie auch das Phasi Charoen-like Virus wurden erstmals aus einem Tiefensequenzier-Screening aus Thailand und China beschrieben (Chandler et al. 2014, Li 2015).



**Abb. 14:** Maximum likelihood Stammbaum von Phasiviren und repräsentativen Vertretern der Familie *Phenuiviridae*. Grundlage des Stammbaums war ein Nukleotidalignent erstellt mittels MAFFT aus der Geneious Software. Durchgeführt wurde eine maximum likelihood Analyse (PHYML) mit dem JC96 Substitutionsmodell und 1000 bootstrap Replikaten. Gerootet wurde zum Rice Stripe Virus, einem Tenuivirus. Farblich hinterlegt sind die neuen Phasiviren. Schwarz sind wichtige Vertreter aus der Familie *Phenuiviridae*.

Um zu untersuchen welche Moskitospezies und wie viele Moskitos pro Pool mit KNUST-Aedes Virus und KNUST-Culex Virus infiziert waren, wurde die RNA von allen 20 Einzelmoskitos der viruspositiven Pools extrahiert und anschließend cDNA

synthetisiert. Für beide Viren wurde jeweils eine spezifische PCR etabliert und die Proben getestet (siehe 2.2.9.6).

In den virushaltigen Pools waren zwischen einem und 14 Moskitos positiv. Die Prävalenzen von KNUST-Aedes Virus und KNUST-Culex Virus in den Proben lassen sich jetzt genau bestimmen und liegen bei 0,9 % (12/1236) und 11 % (134/1236).

**Tab. 17:** Viruspositive Moskitos der positiven Moskitopools

Virus	Moskito	Spezies	Herkunft
P01	M0001-Gh2011	<i>Aedeomyia lepiothauma africana</i>	WG
P02 <sup>+</sup>	M0025-Gh2011	<i>Aedes stegomyia albopictus</i>	BG
	M0027-Gh2011	<i>Aedes stegomyia albopictus</i>	WG
	M0036-Gh2011	<i>Aedes stegomyia soleatus</i>	BG
	M0038-Gh2011	<i>Aedes stegomyia soleatus</i>	WG
	M0040-Gh2011	<i>Aedes stegomyia soleatus</i>	BG
P03 <sup>+</sup>	M0041-Gh2011	<i>Aedes stegomyia soleatus</i>	BG
	M0042-Gh2011	<i>Aedes stegomyia soleatus</i>	BG
	M0047-Gh2011	<i>Aedes stegomyia soleatus</i>	BG
	M0048-Gh2011	<i>Aedes stegomyia soleatus</i>	BG
	M0049-Gh2011	<i>Aedes stegomyia spp</i>	BG
	M0050-Gh2011	<i>Aedes stegomyia spp</i>	BG
	M0059-Gh2011	<i>Mansonia spp</i>	BG
P04 <sup>+</sup>	M0070-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0071-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0073-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0074-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0075-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0076-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0077-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0080-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
P05 <sup>+</sup>	M0081-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0083-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0084-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0085-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0088-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	BG
	M0090-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	BG
	M0098-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0099-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
P06 <sup>+</sup>	M0101-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0102-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	BG
	M0117-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG
	M0120-Gh2011	<i>Culex culex pipiens</i>	WG

P07 <sup>+</sup>	M0123-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
	M0127-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0128-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0131-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
	M0132-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
	M0136-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0137-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0138-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0139-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0140-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
P08	M0149-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0150-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
	M0153-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
	M0155-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0158-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0159-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
P09 <sup>+</sup>	M0165-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0166-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0167-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0170-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0171-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	WG
	M0173-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
	M0174-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
	M0175-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
P10 <sup>+</sup>	M0181-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>pipiens</i>	BG
	M0186-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0187-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0189-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0190-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0192-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0195-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0197-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0199-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	BG
	M0200-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
P11 <sup>+</sup>	M0201-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0202-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0203-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0204-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0207-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0214-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0215-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0216-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0217-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0218-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG

	M0219-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0220-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
P12 <sup>+</sup>	M0222-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0223-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	BG
	M0225-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0226-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0230-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0235-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0236-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
P13 <sup>+</sup>	M0243-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0245-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0246-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0248-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0250-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0252-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0254-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0256-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0258-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0259-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
P14 <sup>+</sup>	M0261-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	BG
	M0263-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0268-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	BG
	M0269-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0270-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0271-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0273-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0275-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	BG
	M0276-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0277-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0278-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
M0279-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG	
P15 <sup>+</sup>	M0283-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0284-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0285-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	BG
	M0286-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0287-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0288-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0289-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	WG
	M0299-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>cinereus</i>	WG
P17 <sup>+</sup>	M0326-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	BG
	M0330-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG
	M0333-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG
	M0335-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG
	M0337-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG

P24	M0462-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG
	M0466-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG
	M0467-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG
	M0468-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG
	M0469-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	WG
	M0471-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	BG
	M0472-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	BG
	M0475-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	BG
	M0479-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	BG
P28	M0557-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	BG
P50 <sup>+</sup>	M0982-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	BG
	M0985-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culiciomyia</i>	<i>nebulosus</i>	BG
P54	M1077-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>eumelanomyia</i>	<i>horrideus</i>	WG
P55	M1086-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>eumelanomyia</i>	<i>horrideus</i>	BG
	M1088-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>eumelanomyia</i>	<i>horrideus</i>	BG
	M1089-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>eumelanomyia</i>	<i>horrideus</i>	BG
P56	M1102-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>eumelanomyia</i>	<i>horrideus</i>	BG
	M1107-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>eumelanomyia</i>	<i>horrideus</i>	BG
	M1120-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>eumelanomyia</i>	<i>horrideus</i>	BG
P57	M1139-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>culex</i>	spp	WG
P58 <sup>+</sup>	M1154-Gh2011	<i>Culex</i>	<i>eumelanomyia</i>	<i>wigglesworthi</i>	BG
P59 <sup>+</sup>	M1163-Gh2011	<i>Culex</i>	spp		WG
	M1164-Gh2011	<i>Culex</i>	spp		BG
	M1165-Gh2011	<i>Culex</i>	spp		BG
	M1180-Gh2011	<i>Culex</i>	spp		BG

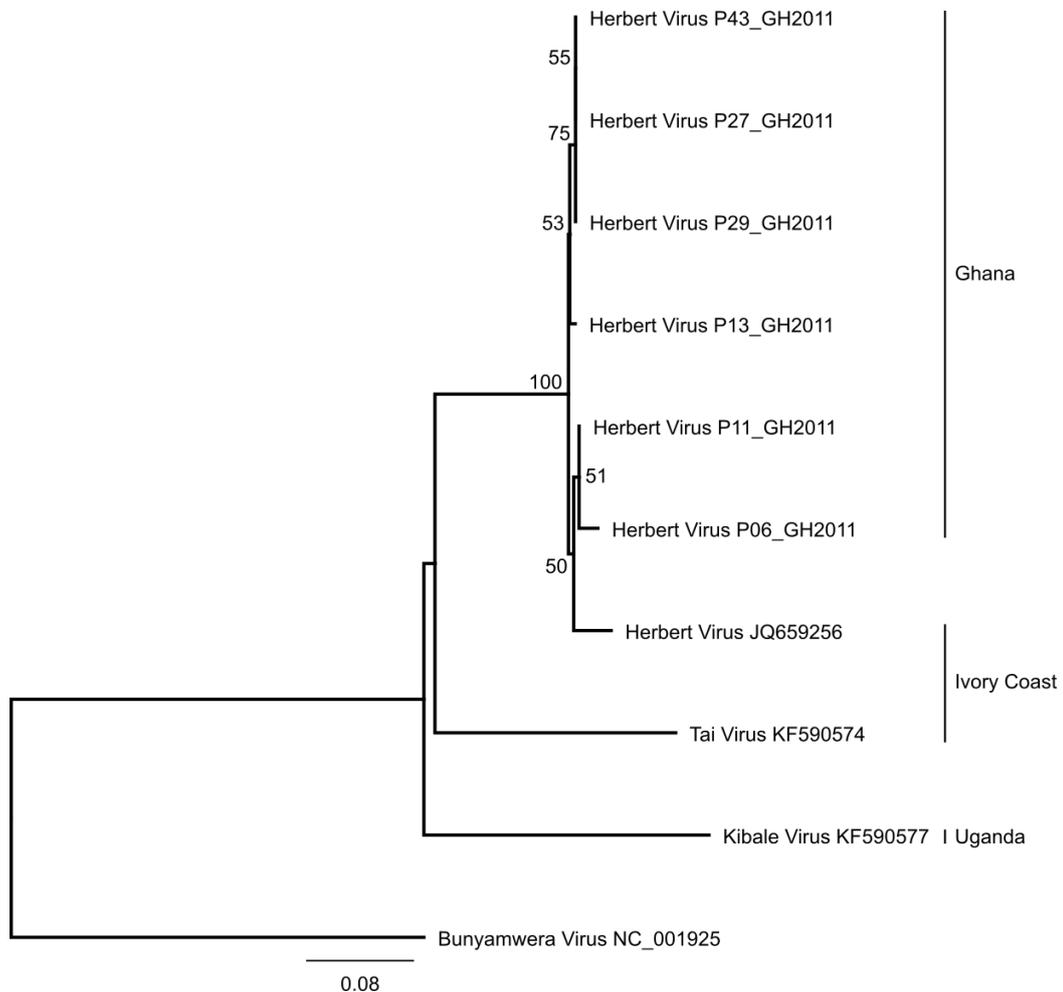
<sup>+</sup> die Sequenz des Pools zeigt Doppelpeaks

Bei der Auswertung der Moskitopools fiel auf, dass bei 17 von den 25 positiven Pools (68 %) Doppelpeaks in den Sequenzen vorlagen. Hier ist also davon auszugehen, dass verschiedene Moskitos in den Pools mit unterschiedlichen Varianten der Viren infiziert sind. Diese ließen sich nun entsprechend der Sequenzen der einzeln getesteten Moskitos zuordnen. Allerdings wiesen auch einige der Virussequenzen der Moskitos Doppelpeaks auf, sodass in diesen Fällen eine Doppelinfektion des Moskitos mit verschiedenen Virusvarianten vermutet wird.

#### 3.2.4.2 Screening auf Orthobunya- und Herbeviren

Als nächstes wurden alle Moskitopools mit einer generischer RT-PCR auf Infektionen mit Viren der Genera *Orthobunyavirus* und *Herbivirus* getestet. Die Proben wurden mit zwei unterschiedlichen nested RT-PCR-Assays getestet. Sechs Moskitopools waren

positiv. In den Pools P13, P27 und P29 wurde in der nested-PCR mit Orth-F1 und Orth-R2 ein PCR-Produkt von 273 bp und in den Proben P06, P11 und P43 in der nested-PCR mit den Primerpaaren Orth-F3 und Orth-R4 ein Produkt von 152 bp amplifiziert.



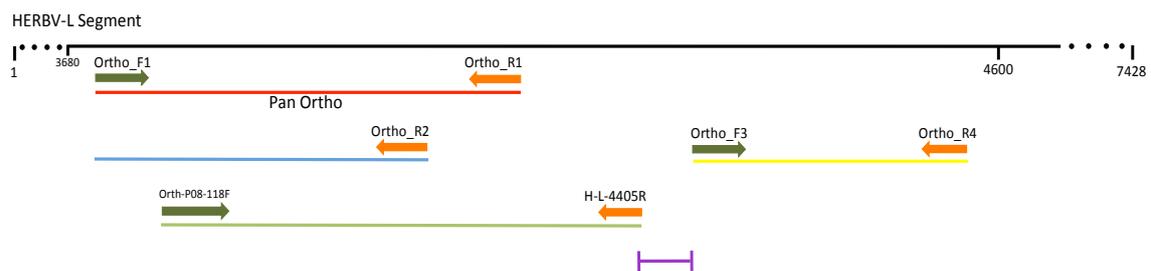
**Abb. 15:** Phylogenetische Analyse der ghanaischen Herbert Virus Stämme. Mit Hilfe der geneious Software wurde ein MAFFT Alignment erstellt. Die Stammbaumanalyse erfolgte mittels maximum likelihood Analyse und dem Jukes Cantor 69 Substitutionsmodell und 1000 bootstrap Replikaten. Als Außengruppe diente hier Bunyamwera Virus einem Orthobunyavirus. Zudem wurden die Herkunftsländer angegeben.

Die Sequenzen der sechs Proben wiesen untereinander eine maximale Distanz von 5 % auf und gehören damit wahrscheinlich zu einer Virusspezies. Der Vergleich der amplifizierten Sequenzen mit Sequenzen in der NCBI Datenbank mittels BLASTn ergab Ähnlichkeiten zwischen 95 % und 100 % zu Herbert Virus, einem von der Arbeitsgruppe

beschriebenen insektenspezifischen Bunyavirus (Junglen et al. 2009; Marklewitz et al. 2013).

Mit einem spezifischen Primer basierend auf dem L-Segment des Herbert Virus (H-L-4339R) und einem für die ghanaischen Stämme spezifischen Primer (Orth-P08-118F), konnte die Sequenzinformation der Stämme P13-GH2011, P27-GH2011 und P29-GH2011 auf insgesamt 618 nt verlängert werden (Abb. 16).

Die Virussequenzen der Pools P06, P11 und P43 konnten durch PCR mit den Primern Orth-P08-118F und H-L-4339R auf eine Länge von ca. 450 nt verlängert werden. Zwischen diesem Genomfragment und einem Fragment von 124 nt welches durch eine alternative PCR (mit den Primern Ortho\_F3 und Ortho\_F4) generiert werden konnte, lag eine Lücke von 91 nt, die sich auch durch wiederholte Versuche nicht schließen ließ.



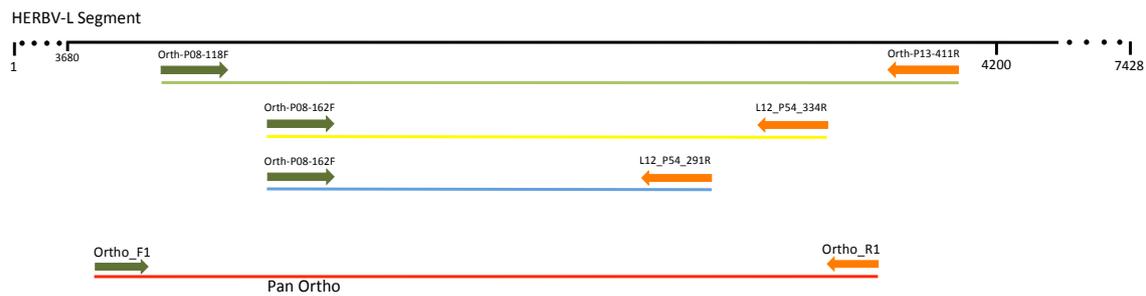
**Abb. 16:** Vereinfachte Darstellung der PCR-Varianten zur Sequenzierung von orthobunyaähnlichen Viren. Zur Orientierung ist das L-Segment des Herbertvirus dargestellt. Eingezeichnet sind die Produkte der generischen Ortho-PCR (rote Linie) und eine nested PCR Varianten (blaue Linie). Gelb zeigt eine alternative Ortho-PCR, welche hinter dem Motif E der konservierten Region liegt. Die PCR-Produkte zur Verlängerung der Sequenzinformation der Pools P13-GH2011, P27-GH2011 und P29-GH2011 wurden in grün dargestellt. Die Lücke zwischen beiden Sequenzfragmenten ist in lila eingezeichnet. Grüne Pfeile stellen Forward-Primer dar und orange Reverse-Primer.

Zur Bestimmung der exakten Infektionsrate und der infizierten Mosquitoarten, wurden alle Moskitos der viruspositiven Pools einzeln auf eine Infektion mit dem Herbert Virus getestet.

**Tab. 18:** In Ghana identifizierte Stämme von Herbert Virus

Stamm	Spezies	Fangort	% Homologie zu Herbert Virus F23/CI/2004
M0257-Gh2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	WG	96,2%
M0538-Gh2011	<i>Cx. nebulosus</i>	BG	97,7%
M0540-Gh2011	<i>Cx. nebulosus</i>	BG	96,9%
M0566-Gh2011	<i>Cx. nebulosus</i>	BG	100%
M0569-Gh2011	<i>Cx. nebulosus</i>	WG	96,9%
M0572-Gh2011	<i>Cx. nebulosus</i>	WG	98,5%
M0105-Gh2011	<i>Cx. pipiens</i>	WG	96,2%
M0120-Gh2011	<i>Cx. pipiens</i>	WG	96,2%
M0201-Gh2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	WG	95,4%
M0206-Gh2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	WG	96,9%
M0211-Gh2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BG	96,2%
M0213-Gh2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	WG	96,9%
M0219-Gh2011	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	WG	96,9%
M0858-Gh2011	<i>Cx. nebulosus</i>	BG	94,6%

Dies erfolgte zunächst mit einer PCR mit spezifischen Primern, Orth-P08-118F und Orth-P13-411R. Mit dieser PCR wurden die Moskitos der Pools P13, P27 und P29 getestet. Hier zeigten sich bereits 6 Moskitos positiv. Die Einzelmoskitos der drei weiteren Pools P06, P11 und P43 wurden mit den Primern Orth-P08-162F und L12\_P54\_334R getestet und vier positive Moskitos gefunden. Mit der angeschlossenen *nested* PCR, mit den Primern Orth-P08-162F und L12\_P54\_291R konnten vier weitere Moskitos detektiert werden. Die Virussequenzen zeigten eine Identität von 94,9 % bis 100 % zu Herbert Virus Stamm F23/CI/2004. Von den 120 getesteten Moskitos waren insgesamt nur 14 positiv (1,1 %). (siehe Tab. 18).



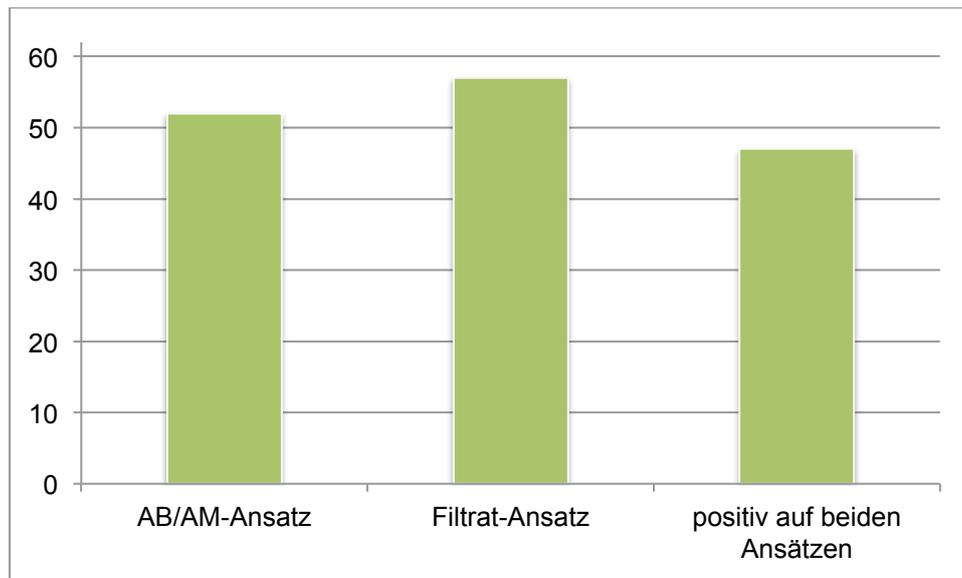
**Abb. 17:** Schemazeichnung der PCR-Varianten zur Detektion der Herbert-ähnlichen Viren in Moskitos. Zur Orientierung wurde das L-Segment des Herbertvirus herangezogen. Die rote Linie kennzeichnet die Pan Ortho PCR. Die grüne, gelbe und blaue Linie kennzeichnen die verwendeten PCR-Ansätze. Grüne Pfeile kennzeichnen Forward-Primer und Reverse-Primer sind in orange dargestellt.

Als nächstes wurden die männlichen Moskitos (46 Pools à 10 männliche Moskitos) auf das Herbert Virus getestet. Eine konventionelle nested RT-PCR und eine *Real-Time* PCR lieferten keine positiven Ergebnisse.

### 3.3 Virusanzucht in Zellkultur

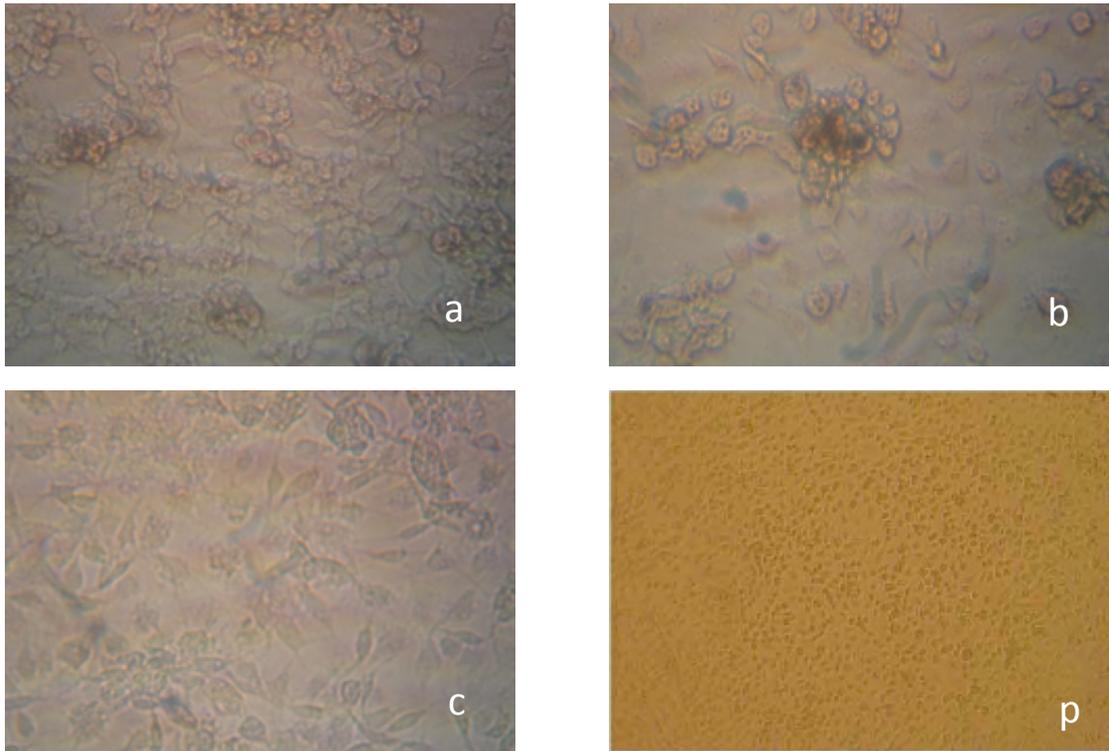
Um mögliche weitere in den Proben vorhandene Viren detektieren zu können die mit den verwendeten PCR-Testsystemen nicht nachgewiesen werden konnten, sowie die Viren aus den PCR positiv getesteten Pools isolieren zu können, wurde jeweils ein Aliquot der homogenisierten Moskitopools auf Zellen gegeben, um die Viren in Zellkultur zu isolieren. Aliquots der 62 Moskitopools wurden jeweils steril filtriert oder unter Einsatz von Antibiotikum/Antimykotikum wie im Methodenteil beschrieben (siehe ab 2.2.5.2) verwendet um C6/36 und Vero E6/7 Zellen zu infizieren. Alle Ansätze wurden über einen Zeitraum von fünf Wochen und über vier Passagen kultiviert und die Zellen mikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht.

Insgesamt induzierten 52 (84 %) der Pools einen erkennbaren CPE auf C6/36 Zellen bei denen Antibiotikum und Antimykotikum (AB/AM-Ansatz) im Medium verwendet wurde. Bei den steril filtrierten Proben entwickelte sich bei 57 Pools (92 %) ein CPE. Interessanterweise bildete sich nur bei 47 Pools unter beiden Bedingungen ein CPE auf C6/36 Zellen aus (Abb. 18). Dies zeigt, dass einige Viren nur unter bestimmten Bedingungen in Zellkultur zu isolieren sind.



**Abb. 18:** CPE-positive Zellkulturansätze. Von den 62 Proben wurde jeweils in zwei verschiedenen Varianten versucht Viren in Zellkultur zu isolieren. Hierzu wurde das Moskitohomogenat entweder steril filtriert (Filtrat-Ansatz) und anschließend auf Zellen gegeben oder unfiltriert auf Zellen gegeben und anschließend Antibiotikum und Antimykotikum zum Wachstumsmedium gegeben (AB/AM-Ansatz). Die Ausbildung eines CPE unter Verwendung des Filtrat-Ansatzes ist in rot dargestellt und unter Verwendung des AB/AM-Ansatzes in blau. Der Anteil CPE-positiver Pools, welche in beiden Ansätzen einen CPE ausgebildet haben, ist in grün dargestellt.

Bei 47 Pools (76 %) bildete sich in dem AB/AM-Ansatz ab der 0. Passage (Infektionsansatz) ein reproduzierbarer CPE aus. Fünf Pools zeigten erst in späteren Passagen einen reproduzierbaren CPE (3 Pools in der 2. Passage, 1 Pool in der 3. Passage, und 1 Pool erst in der 4. Passage). In den steril filtrierten Ansätzen zeigten die Zellen bei 19 Pools (31 %) ab der 0. Passage einen CPE, bei 33 der Pools (53 %) ab der 1. Passage, zwei Pools ab der 2. Passage und bei drei Pools ab der 4. Passage. Bei den Vero E6/7 Zellen waren bei 24 Pools im Infektionsansatz (0. Passage) leichte Veränderungen der Zellen zu beobachten. Diese leichten morphologischen Veränderungen ließen sich jedoch nach wiederholten Versuchen nicht reproduzieren. Wahrscheinlich wurden diese Veränderungen durch die Zugabe der Moskitohomogenate hervorgerufen.



**Abb. 19:** CPE auf C6/36 Zellen. Homogenisierte Pools von Moskitos aus Ghana wurden in C6/36-Zellkulturen inokuliert und bei 28°C inkubiert. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch auf cytopatische Veränderungen hin beobachtet. Dargestellt sind a, Probe P24 C6/36 AB 0.P., b, Probe P26 C6/36 AB 0.P., c, Probe P32 C6/36, 1.P. filtrat, d, Kontrolle C6/36

### 3.3.1 PCR Screening der CPE positiven Zellkulturüberstände

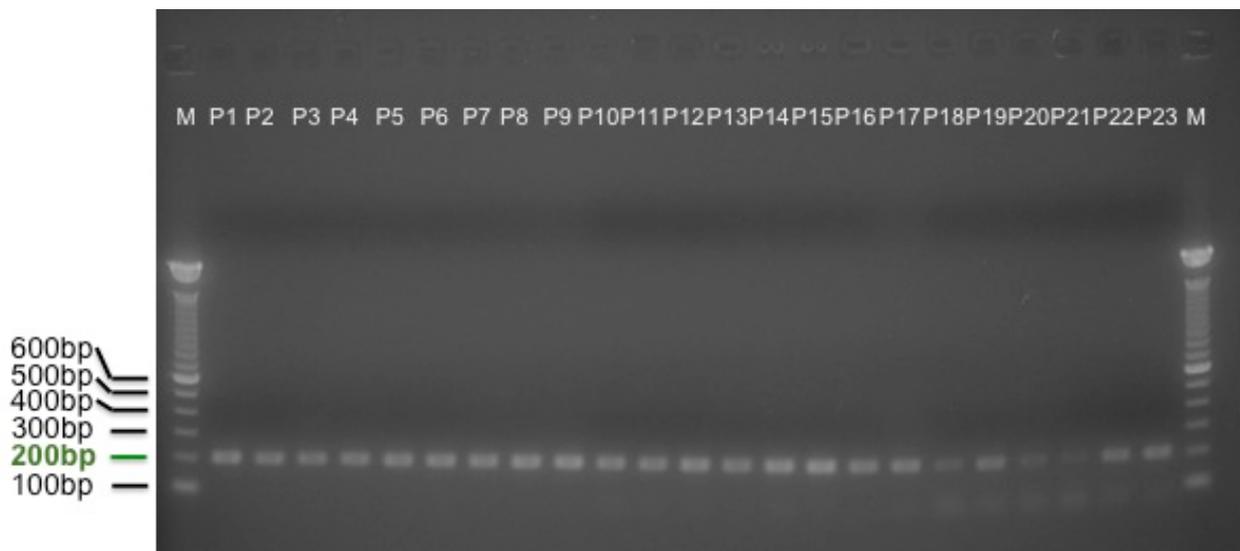
Die Zellkulturüberstände von Zellen mit morphologischen Veränderungen wurden zunächst mit den gleichen PCR-Systemen wie die Moskitopools getestet (siehe ab 2.2.9). Von allen CPE positiven Zellkulturüberständen der 4. Passage wurde RNA extrahiert und cDNA synthetisiert wie unter 2.2.8 beschrieben. Hierzu wurden jeweils 5µl RNA von jedem Ansatz (C6/36 AB/AM und Filtrat sowie Vero E6 AB/AM und filtrat) gepoolt und aus diesem Ansatz cDNA hergestellt.

#### 3.3.1.1 Untersuchung auf GB-, Alpha-, Ortho-, Phlebo- und Mesoniviren

Die Untersuchung der CPE-positiven Zellkulturüberstände auf GB-, Alpha-, Orthobunya-Phlebo- und Mesoniviren erbrachte kein positives Ergebnis.

### 3.3.1.2 Untersuchung auf Flaviviren

Die CPE-positiven Zellkulturüberstände wurden mit einer generischen nested RT-PCR auf Flaviviren getestet und bei 43 der 62 Proben wurden Genomfragmente von Flaviviren detektiert (Tab. 19, im Tabellenverzeichnis Seite 116). Exemplarisch sind die Amplifikate der Zellkulturüberstände die mit den Pools P1-P23 infiziert worden sind, in Abb. 20 dargestellt. Bei sechs Zellkulturüberständen wurde nur ein sehr schwaches Bandensignal detektiert.

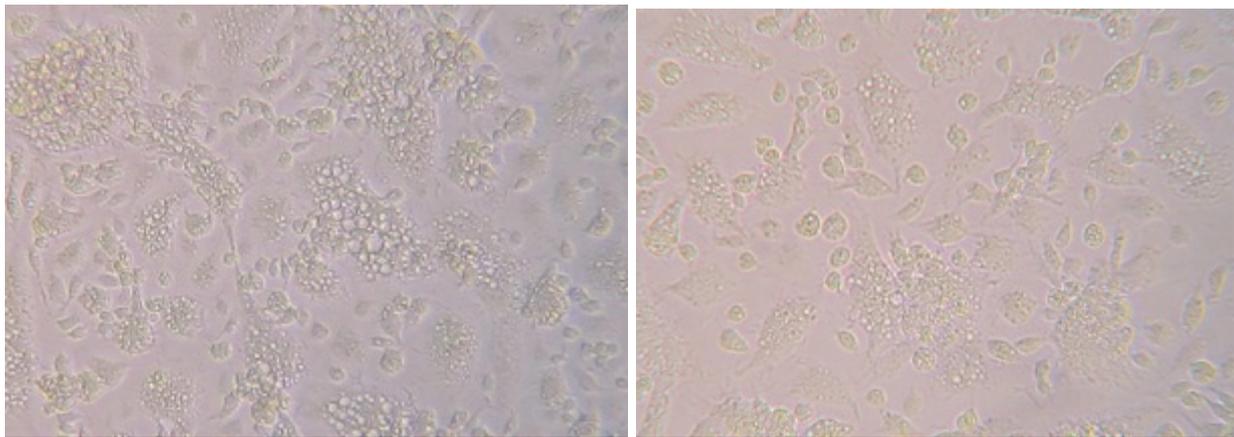


**Abb. 20:** Repräsentative Darstellung der PAN Flavi nested PCR. Exemplarisch gezeigt sind die Pools 1-23 mit der zu erwartenden Bandenhöhe bei ca. 200 bp.

Es wurden exemplarisch 17 der 43 Banden sequenziert und mit den Sequenzen aus den Moskitos verglichen. In 15 Proben wurde Culex Flavivirus nachgewiesen. Dieses Virus wurde im Vorfeld schon in den Moskitopools, die zur Infektion der Zellkultur verwendet wurden nachgewiesen, und es ist davon auszugehen, dass dieses vorher in den Moskitos nachgewiesene Virus erfolgreich isoliert werden konnte. Weiterhin konnte das Culex Flavivirus noch in zwei weiteren Zellkulturüberständen nachgewiesen werden (P16-GH2011 und P56-GH2011), bei denen das Virus nicht in den für die Infektion verwendeten Moskitopools nachgewiesen werden konnte. Eine Isolierung der Kumasi-ISF-A und Kumasi-ISF-B gelang nicht.

### 3.3.2 Exkurs: Isolierung von Viren aus einzelnen Moskitos

Exemplarisch wurde auch aus Einzelmoskitos versucht, Viren in der Zellkultur zu isolieren. Hierzu wurden 10 µl des Moskitolysates zusammen mit 290 µl L-15 Medium ohne Zusätze auf zu 80 % konfluente C6/36 Zellen in einem Well einer 24-Well Platte gegeben und eine Stunde im Brutschrank bei 28 °C ohne Begasung inkubiert und anschließend mit 700 µl L-15 mit AB/AM auf ein Wachstumsvolumen von 1 ml gebracht. Nach zwei Tagen waren erste leichte morphologische Veränderungen zu erkennen und am 6. Tag nach Infektion wurde der Überstand geerntet (Beispielhaft an M0088-Gh2011 in Abb. 21). Bei den Proben M0060-Gh2011 und M0088-Gh2011 ließ sich wiederholt über vier Passagen ein ähnlicher CPE induzieren. Bei M0025-Gh2011 war in den ersten drei Passagen ein CPE erkennbar, der sich nachfolgend nicht reproduzieren lassen konnte.



**Abb. 21:** CPE von M0088-GH2011 auf C6/36 nach sechs Tagen. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch auf cytopatische Veränderungen hin beobachtet.

Aus dem infektiösen Zellkulturüberstand der fünf Passagen der mit den 10 Moskitos infizierten C6/36 Zellen wurde mit Hilfe des MagNA pure Roboters RNA extrahiert und anschließend cDNA synthetisiert (siehe 2.2.8). Es kann davon ausgegangen werden, dass hier erfolgreich noch weitere Viren isoliert wurden. Zum aktuellen Zeitpunkt lässt sich noch nicht sagen, um welche Viren es sich handelt. Weitere Testungen bezüglich der Infektiösität dieser Zellüberstände sollten im weiteren Verlauf erwogen werden.

Für mögliche weitere Testungen auch auf bisher nicht detektierte Viren wurde der infektiöse Zellüberstand bereits vorbereitet. Hier kann zum Beispiel eine elektronenmikroskopische Diagnostik oder Multiplex Sequenzierung erwogen werden.

Für diese Untersuchungen sind hohe Konzentrationen viraler Partikel notwendig. Um diese generieren zu können kann das Verfahren der Ultrazentrifugation angewandt werden. Für das Protokoll der Ultrazentrifugation (siehe 2.2.6) wurden 500 µl der 4. Passage des Moskitos vorbereitet und bei -80 °C gelagert. Als Ausblick ist zu erwägen, die Proben später mittels Next Generation Sequencing auf bisher nicht detektierte Viren zu untersuchen. Die möglichen Ergebnisse dieser weiteren Schritte lagen bis zum Abgabetermin dieser Arbeit noch nicht vor.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die genetische Virusdiversität in Moskitos, die auf dem Campusgelände der Universität Kumasi in Ghana im Frühjahr 2011 gefangen wurden, beschrieben. Es wurden zwei bisher unbekannte Flaviviren sowie neue Stämme eines *Culex* Flavivirus und zwei bisher unbekannte Phenuiviren per PCR nachgewiesen. Zusätzlich konnte eine Vielzahl an noch nicht näher identifizierten Viren in Zellkultur isoliert werden. Die virologischen Daten aus zwei Fangpunkten, dem Botanischen Garten und der Wohngegend, wurden miteinander verglichen und mögliche Unterschiede in der Moskitoabundanz und Virusprävalenz herausgearbeitet. Die Unterschiede zwischen den Fangpunkten waren zum einen eine deutlich höhere Anzahl an gefangenen Moskitos am Fangpunkt des Botanischen Gartens sowie eine höhere Diversität in der Wohngegend.

### 4.1 Virusprävalenz und Variabilität auf dem Campusgelände der Universität

In früheren Untersuchungen des Institutes für Virologie der Uniklinik Bonn wurden in Serumproben von Flughunden (*Eidolon helvum*) aus Ghana GB-ähnliche Viren nachgewiesen (unveröffentlichte Daten). Es ist unklar wie diese Viren übertragen werden und es sollte untersucht werden, ob Moskitos wie bei anderen Viren der Familie *Flaviviridae* auch als Übertragungsvektoren fungieren. Eine mögliche Ausbreitung dieser Viren in diesem Habitat stellt durch die räumliche Nähe zu den dort lebenden und arbeitenden Menschen auch für diese ein potentiell gesundheitliches Risiko.

#### 4.1.1 Moskitoprävalenz und -diversität

Zu Beginn dieser Arbeit gab es hinsichtlich der Prävalenz und Diversität von Moskitos in Ghana bisher keine Daten. Der Kwame Nkrumah University of Science and Technology (KNUST) Botanic Garden (Breitengrad: 6°35 N - 6°40 N, Längengrad: 1°30 W – 1°35 W) umfasst ein 12.9 Hektar großes Gebiet mit einem halbimmergrünen Regenwald, der im Jahre 1960 geschaffen wurde. Dokumentiert sind ein durchschnittlicher Niederschlag von 731 mm/Jahr und einer Durchschnittstemperatur von 21.55 °C – 32.12 °C (KNUST Meteorologischem Institut, 2006 unveröffentlichte Daten) (AddoFordjour 2008). Mit einer gemessenen Temperatur zwischen 20 °C und 33 °C sowie einer Luftfeuchtigkeit von bis zu 73 % bestätigen die in dieser Arbeit erhobenen Werte die bisher veröffentlichten

Daten. Das Vorkommen von Moskitos wird durch Faktoren wie Nahrungsangebot, Vorhandensein von Brutstätten und durch abiotische Faktoren wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit bestimmt. Bei höheren Temperaturen kann man von einer höheren Stechrates aufgrund eines schnelleren Metabolismus der Moskitos ausgehen. Dies beeinflusst die Reproduktionsgeschwindigkeit und damit einhergehend die Populationsgröße (Kramer und Ebel 2003). Eine Studie aus der Accra-Region aus dem Jahr 2007 zeigte, dass die ideale Temperatur für die Entwicklung der Mückenlarven in Ghana zwischen 30 °C - 36.2 °C lag (Opoku und Ansa-Asare 2007). Hier nutzen die Larven die warmen Lebensräume für die optimale Entwicklung. Ebenfalls begünstigt eine hohe Luftfeuchtigkeit (65 % – 95 %) die Verbreitung vieler Mosquitoarten. Somit bieten die hier gemessenen Daten eine gute Voraussetzung für die Entwicklung der Moskitos und bestätigen die bisherigen Messergebnisse.

Die Moskitos der vorliegenden Arbeit wurden von Februar bis März in der Trockenzeit gefangen, die sich in der Ashanti Region von Dezember bis Februar ausdehnt und im März langsam in die Regenzeit übergeht. Mai und August weisen die höchsten Niederschlagswerte auf (<http://www.ghanadistricts.com/region>). Ein verlängerter Fangzeitraum und eine Ausdehnung in die Regenzeit hätten die Fangrate eventuell erhöhen können. In dieser Arbeit wurden insgesamt 1.622 Moskitos an 26 Fangtagen gefangen.

In Ghana sind bislang 24 Moskitogenera beschrieben, die sich auf 134 Spezies aufteilen (WRBU). Die Anzahl der in dieser Arbeit in Kumasi gefangenen Moskitogenera betrug 12, dies entspricht 54,2 % der bisher in Ghana beschriebenen Moskitogenera. Es wurden 25 verschiedene Spezies gefangen (18,7 %). Wenn man weitere Veröffentlichungen mit in die Zusammenschau einbezieht, werden für Ghana ein paar Mosquitoarten zusätzlich beschrieben. Beispielhaft ist *Culex quinquefasciatus* bei WRBU nicht aufgeführt, wird aber in der Arbeit von Appawu als möglicher Vektor von einer Filiarose beschrieben (Appawu et al. 2001). Ebenfalls erwähnt werden die Arten *Diceromyia* (Reinert 1970) an der südlichen Küste von Ghana und *Eratmopodites silvestris*, mit bevorzugten Brutplätzen in wassergefüllten Reservoirs, ebenfalls im Süden von Ghana (Surtees 1958). Dass diese noch nicht bei Walter Reed aufgenommen wurden, könnte daran liegen, dass die Website von Walter Reed nicht

regelmäßig aktualisiert wird. Von den bisher in Ghana beschriebenen Genera, laut WRBU sowie inklusive der Genera aus den Veröffentlichungen, konnten 11 Genera auch in dieser Arbeit übereinstimmend nachgewiesen werden. Auf Speziesebene, stimmten 11 mit den beschriebenen überein. Weitere 12 Spezies aus dieser Arbeit wurden bisher noch nicht für Ghana beschrieben. Bei zwei Genera *Aedes* und *Lutzia* konnten die gesammelten Moskitos lediglich auf Genusebene bestimmt werden. Hier ist somit keine Aussage bezüglich der Spezies möglich und somit keine genauere Betrachtung und Vergleich mit bisherigen Publikationen möglich.

Im Botanischen Garten wurden 2/3 mehr Moskitos als in der Wohngegend gefangen. Jedoch wies die Wohngegend eine höhere Diversität an Moskitos als der Botanische Garten auf. Moskitos der folgenden Genera wurden ausschließlich im Botanischen Garten nachgewiesen: *Anopheles*, *Eretmapodites*, *Mimomyia*, *Toxorhynchites* und *Uranotaenia*. Hingegen wurden Spezies des Genus *Aedeomyia* nur in der Wohngegend gefangen.

Folgende Moskitoarten sind deutlich häufiger im Botanischen Garten gefangen worden: *Culex culiciomyia nebulosus*, *Culex eumelanomyia horrideus*, *Aedes* spp., *Mimomyia*, *Culex eumelanomyia wigglesworthi*, *Toxorhynchites* spp.. In vergleichenden Studien wurde ein höheres Vorkommen der Genera *Aedes*, *Mansonia*, *Mimomyia* und *Toxorhynchites* innerhalb von ungestörten Habitaten wie z.B. Waldgebiete berichtet (Martha et al. 2014), wobei die Gattung *Toxorhynchites* keine Blutmahlzeit benötigt, sondern sich von Blütennektar und anderen zuckerhaltigen Pflanzensäften ernährt und vorwiegend in Wäldern vorkommt (Collins und Blackwell 2000). Für *Culex* spezies wird ein einheitliches Vorkommen beschrieben (Opoku und Ansa-Asare 2007). Dies zeigt, dass sie sehr vielseitig sind und sich an die unterschiedlichen Gegebenheiten angepasst haben. Diese Beschreibung korreliert mit den Ergebnissen dieser Arbeit. *Culex* spp. und im Besonderen *Culex nebulosus* wurden an beiden Fangorten mit Abstand am häufigsten gefangen (57,7 %).

*Culex nebulosus* ist eine weit verbreitete Moskitoart, die nicht dafür bekannt ist, Menschen zu stechen. Sie beziehen ihre Blutmahlzeit aus Vögeln. In einer früheren Arbeit wurde die „Umverteilung“ von *Culex* Moskitos erklärt, bei denen *Culex nebulosus* in den arthropogen geprägten Gebieten von *Culex quinquefasciatus* verdrängt wurde,

die nun deutlich häufiger dort angetroffen werden können (Adebote et al. 2006). *Culex nebulosus* ist bislang als Vektor von z.B. Yaoundé Virus (YAOV) bekannt, welches in verschiedenen subsaharischen afrikanischen Regionen sowohl aus Moskitos als auch Vögeln isoliert werden konnte (Williams et al. 2012). Das Yaoundé Virus ist ein Flavivirus innerhalb des JEV-Serokomplexes, welches z.B. das humanpathogene JEV und WNV mit einschliesst (Kuno et al. 1998). Bisher konnte jedoch keine Infektion mit dem YAOV beim Menschen nachgewiesen werden (Adam und Digoutte 2005). Eine Verdrängung von *Culex* spezie hin zu einem vermehrten Vorkommen von *Culex quinquefasciatus* kann in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. *Culex nebulosus* ist mit Abstand die häufigste Spezie unter den gefangenen Moskitos.

Bei der relativen Bewertung der Fangzahlen ist allerdings herauszustellen, dass es sich bei den alleinig in dem Botanischen Garten gefangenen Genera (*Anopheles*, *Eretmapodites*, *Mimomyia*, *Toxorhynchites* und *Uranotaenia*) um insgesamt kleine Fangzahlen von insgesamt nur 27 Individuen handelt. Z. B. wurde nur ein Mosquito des Genus *Aedomyia* im Wohngebiet gefangen. Für eine aussagekräftige Berechnung im Hinblick auf einen signifikanten Unterschied sollten größere Fangzahlen vorliegen. Auf die Gesamtzahl gefangener Moskitos zeigte sich eine höhere Diversität in der Wohngegend wie auch eine höhere Gleichmäßigkeit. In der Theorie, wie auch in vergleichenden Publikationen aus der Elfenbeinküste (Junglen et al. 2009) wäre eine höhere Diversität im Botanischen Garten zu erwarten gewesen. In der vorliegenden Arbeit ist dies nicht der Fall. Bei den Berechnungen werden jedoch nur jene Moskitos mit einbezogen, welche bis auf die Spezie charakterisiert werden konnten. Möglicherweise haben die „unbestimmbaren“ Moskitos einen Einfluss auf die hiesigen Berechnungen und deren Ergebnisse. Auch im Bezug auf die Diversität könnte ein längerer Fangzeitraum mit einer höheren Moskitoanzahl ggf. die Daten verändern. Die hier aufgezeigte höhere Diversität in der Wohngegend ist vor allem auf die höhere Spezievariabilität innerhalb des Gattung *Culex* zurückzuführen. In der Wohngegend konnten vier *Culex*-Arten gefangen werden, welche nicht im Botanischen Garten gefangen wurden. Von diesen sind bisher zwei, *Cx. cx. decens* und *Cx. culiciomyia cinereus*, als Moskitos in Ghana beschrieben (WRBU), hingegen *Cx. cx. choleyi* und *Cx. cx. terzii* bisher noch nicht.

Für Vergleiche standen Daten aus der Elfenbeinküste bezüglich der Prävalenz und Diversität der dortigen Moskitos zur Verfügung (Junglen et al. 2009). Dort sind im Jahr 2004 entlang einer geraden Transekte über vier Monate Moskitos gefangen worden. Die Transekte verlief vom Primärwald über den Sekundärwald, Kaffee- und Kakaopflanzungen, Reis- und Maisfelder bis in ein Dorf. Mit den auch in dieser Studie genutzten Fallen wurden damals die Moskitos gefangen und deren Ausbreitung untersucht (Dissertation Junglen 2007). Junglen beschreibt für die primären, ungestörten Habitate eine Moskitodichte die doppelt so hoch wie die außerhalb des Waldes ist. Diese Tendenz lässt sich auch in der vorliegenden Arbeit nachvollziehen. Die Abundanz einzelner Moskitospezies an der Elfenbeinküste nimmt außerhalb des Waldes zu (Junglen 2007). Dieses lässt sich auch in der vorliegenden Arbeit entnehmen.

*Cx quinquefasciatus* und *Cx pipiens* sind in dieser Arbeit an beiden Fangorten zu finden, vornehmlich und mit höheren Zahlen aber in anthropogen geprägten Gebieten, in dieser Arbeit in der Wohngegend auf dem Campusgelände. Die möglicherweise verschmutzte Kanalisation, die verstopften Abflüsse und die sich dort ansammelnden Abwässer sind Bereiche, in denen die Moskitos gerne brüten und die Larven zu finden sind (Esen et al. 2013, Afrane et al. 2004). Die menschliche Aktivität in der Stadt mit ihren großen Müllplätzen und der schlecht ausgebauten Kanalisation stellt neue artifizielle Brutstätten für die Moskitos bereit (Opoku und Ansa-Asare 2007). Gerade der Müll aus den Haushalten mit Konservendosen, Containern oder liegen gebliebenem Restmüll ist hier hervorzuheben, da sich hier kleine Wassermengen sammeln können. Als Beispiel für artifizielle Brutstätten zeigte *Cx quinquefasciatus* in einer nigerianischen Studie keine bestimmten Vorlieben für Brutstätten, sondern eine breite Möglichkeit des Brütens. Sowohl in der Nähe der Menschen z. B. in Töpfen oder Trögen, wie auch in stehenden Gewässern, ebenso in Baumlöchern oder Blätterkronen finden sich Larven dieser Moskitospezies. Weiter sind dort die Vorliebe für *Cx nebulosus* und *Cx decens* beschrieben, die vermehrt in verschmutztem Wasser gefangen werden konnten und in Bereichen, die einen fauligen Geruch aufwiesen (Aigbodion und Uyi 2013). Erwähnt wurden in diesem Zusammenhang Zahlen aus Kumasi von *Cx quinquefasciatus* die bis zu 3 - 4 x häufiger in bewohnten Gebieten gefangen wurden, als in unbewohnter Gegend (Klinkenberg et al. 2008). Diese Ergebnisse werden in dieser Arbeit bestätigt,

mit 0,2 M/FE im Botanischen Garten, also in unbewohnter Gegend und 1,39 M/FE in der Wohngegend auf dem Campusgelände. Somit kann die höhere Diversität der *Culex*-Moskitos auf die größere Verfügbarkeit von Brutplätzen in der Wohngegend zurückgeführt werden. *Cx quinquefasciatus* wird als wichtiger Vektor von Filariosen in den Tropen, vor allem in Ost Afrika gesehen (Pedersen et al. 1999), bislang sind keine infizierten Moskitos der Spezies *Cx quinquefasciatus* aus Ghana beschrieben worden (Dzodzomenya und Simonsen 1999, Appawu 2001).

Die Spezies *Culex pipiens* ist bislang nicht für Ghana beschrieben worden, wurde allerdings im benachbarten Burkina Faso gefunden (Samuelsen et al. 2004). Auch diese Art ist in der Wohngegend deutlich häufiger zu finden als im Botanischen Garten, mit 0,4 M/FE im BG und 1,18 M/FE in der WG. *Cx. pipiens* Moskitos sind als Vektoren für das Japanische Enzephalitis Virus, West Nil Virus oder St. Louis Enzephalitis Virus bekannt, wobei nur das West Nil Virus in Afrika vorkommt.

Wie auch in der Elfenbeinküste sind in dieser Arbeit sehr wenige *Aedes* Moskitos gefangen worden (0,2 M/FE). Dies kann daran liegen, dass sich diese tagaktiven Moskitos eher in den Baumkronen aufhalten und dadurch nicht von den am Boden stehenden *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup> angelockt wurden (Bonizzoni et al. 2013, Martha et al. 2014). Die *Aedes* Moskitos und deren Untergruppe *Stegomyia* sind dennoch im Verhältnis deutlich häufiger im Botanischen Garten 0,5 M/FE gefangen worden als in der Wohngegend 0,07 M/FE. *Aedes* Moskitos sind bekannte Vektoren einiger humanpathogener Viren wie DENV, CHIKV und YFV. Besorgniserregend ist die schnelle und aggressive Ausbreitung der Spezies *Ae. albopictus*. Ursprünglich beheimatet in Ostasien, hat die Spezies als möglicher Krankheitsüberträger sämtliche Kontinente (außer der Antarktis) besiedelt. Als erstes europäisches Land erfolgte der Nachweis 1979 in Albanien, und hat sich kontinuierlich bis nach Italien, Südfrankreich, aber auch die Südschweiz, ausgebreitet (Diallo et al. 2005, Mackenzie et al. 2002, Barrett und Monath 2003, Panning et al. 2008).

#### 4.1.2 Lockmittel

Die Diversität der gefangenen Moskitospezies könnte aufgrund der hier verwendeten Fallen und Lockmittel, beeinflusst worden sein. Benutzt wurden die *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup>

und die CDC *Light Traps* mit verschiedenen, aber wenig spezifischen Lockmitteln wie beispielsweise Käse, Zuckerwasser oder getragene Socken. Mit diesen Lockmitteln wurden vor allem Spezies gefangen, welche keine ausgeprägte Wirtsspezifität zeigen. Um die für den Menschen potentiell gefährlichen Moskitos anzulocken, wurden getragene T-Shirts und Socken genutzt. Die benutzten Lockmittel gelten als bewährt und praktikabel. Die besten Ergebnisse in der Wohngegend wurden mit den getragenen Socken erzielt. Dieses kann als menschenpezifischer Reiz durch das Aussenden von chemischen Substanzen gewertet werden. Es lässt den Rückschluss zu, dass die Moskitos sich auf den Menschen als Wirt spezialisiert haben. Ein artifizieller Ersatz für den Menschen an sich als Lockstoff, ist damit jedoch längst nicht gegeben. Dies kann nachvollzogen werden, wenn man die Anzahl der mit diesen Fallentypen gefangenen Moskitos mit den Fangergebnissen eines „Human bait catches“ vergleicht. Hier werden Moskitos mit einem Aspirator eingefangen, wenn diese auf entblößter Haut des Menschen gelandet sind. Hier wurden deutlich höhere Fangraten für z.B. Dengue und Malariavektoren beschrieben (Geier et al. 2000).

Im Botanischen Garten wurden die besten Fangfolge mit den *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup> und Limburger Käse als Lockmittel (menschenähnlicher Geruch) erzielt. Studien zum Vergleich der Moskitofallen zeigten, dass *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup> und die Zumba Mosquito Falle (in dieser Arbeit nicht benutzt) einen höheren Fangfolge im Vergleich zur CDC *Light Trap* erzielten, vor allem für *Aedes albopictus* (Bhalala und Arias 2009). Die Zumba Mosquito Falle ist zudem im Bezug auf *Cx. pipiens* den *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup> überlegen (Bhalala und Arias 2009, Rose et al. 2006). Abweichend zu diesen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Studie kaum *Aedes* Moskitos gefangen. Weitere Ergebnisse bezüglich *Culex* Spezies zeigten, dass *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup>, die CO<sup>2</sup> als Lockstoffe verwendeten, genauso wirksam waren wie CDC *Light Traps* mit CO<sup>2</sup> (Roiz et al. 2012). Aufgrund des umfangreicheren Zubehörs und der schwierigen Beschaffung des Gases in Ghana, wurde auf eine CO<sup>2</sup> unterstützte Falle verzichtet.

Mit den *BG Sentinel Traps*<sup>®</sup> konnten deutlich höhere Fangergebnisse erzielt werden als mit den CDC *Light Traps*. Der Vergleich der Fangraten mit den verschiedenen Lockstoffen ergab, dass sich die Moskitos im Botanischen Garten am besten mit Käse und in der Wohngegend am besten mit getragenen Socken anlocken ließen (Tab. 11).

Dies lässt sich am ehesten mit einer bestehenden Affinität der Moskitos auf den Menschen erklären. Eine mögliche Erklärung für die schlechten Ergebnisse der Lichtfallen könnte sein, dass viele weitere Lichtquellen in der Fanggegend vorhanden waren und die Moskitos durch diese abgelenkt wurden.

Die erhobenen Daten zeigten über einen recht kurzen Fangzeitraum eine Übersicht der Abundanz zwischen den beiden Fangorten, und könnte als vorsichtige Einschätzung der exogenen Einwirkung des Menschen auf die Moskitodichte- und Ausbreitung betrachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit in Kumasi mehrheitlich Moskitoarten gefangen wurden, welche bereits in der zur Verfügung stehenden Literatur erwähnt wurden (WRBU). Hingegen wurden 12 Spezies bislang noch nicht beschrieben.

Es wurde ein deutlicher Unterschied an Moskitarten in der natürlichen Umgebung des Botanischen Gartens und der artifiziellen Wohngegend gefunden. In wie weit das menschliche Eingreifen in diese Habitate eine Veränderung der Moskitopopulation hervorgerufen hat, lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren, erweckt aber an mehreren Stellen diesen Eindruck. Die direkte Nähe zum Menschen und seinen Nutztieren im Wohngebiet liefert eine konzentriertere Bereitstellung der Nahrungsmittel sowie der Blutmahlzeit für die Moskitos. Somit könnte die Dichte der Spezies die sich auf Menschen und domestizierte Tiere spezialisiert haben deutlich erhöhen. Zudem entstehen durch die Menschen und ihre „Abfall“-Produkte neue Brutstätten für die Moskitos. Dieses könnte eine mögliche Eintrittspforte für neue Viren und Erreger sein, die zuvor keinen oder nur wenig Kontakt mit dem Menschen hatten.

#### 4.2 PCR Screening auf Pegiviren

Eine Fragestellung zu Beginn der Arbeit war, ob Moskitos in Ghana als potentieller Vektor von GB-Viren (aus der Familie *Flaviviridae*) innerhalb der dort ansässigen Kolonie von Palmenflughunden (*Eidolon helvum*) in Frage kommen. Bisher waren keine Daten hierzu aus Westafrika beschrieben. Alle 62 Pools wurden mit zwei unterschiedlichen PCR Assays (Onestep PCR und RealTime PCR) auf Pegiviren negativ getestet. Dies könnte daran gelegen haben, dass die GB-Viren zu der Fangzeit

dieser Arbeit nicht in der Fledermaus-Population zirkulierten und deswegen kein Nachweis in den Mücken stattfinden konnte. Auch das die hier gesammelten Moskitospezies nicht der vermutete Vektor einer Virusübertragung der GB-Viren auf die Flughunde sind, lässt ein negatives Ergebnis erklären. Ein Nachweis der Viren aus Moskitos konnte bislang nicht erfolgen.

#### 4.3 Detektion neuer Flaviviren in Moskitos und Zellkultur

Die Familie *Flaviviridae* wird in die vier Genera, *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* und *Pegivirus* unterteilt und umfasst mehr als 90 Viruspezies (Knipe et al. 2006). Im Genus *Flavivirus* sind über 70 verschiedene Spezies bekannt (ICTV 2012). Bedeutende Moskito-übertragene Flaviviren sind das DENV, WNV sowie das YFV. Eines der bedeutendsten humanpathogenen Viren, ist das YFV, welches durch *Aedes* Moskitos übertragen wird (Gillett 1971, Baron et al. 1996). Weiterhin sind zahlreiche Flaviviren bekannt, die ausschließlich Moskitos infizieren und nicht auf Vertebraten übertragen werden (Blitvich und Firth 2015). Beispiele hierfür sind das CFAV, sowie das Culex-, und *Aedes* Flavivirus (Cook et al. 2009, Hoshino et al. 2009).

Mit der generischen Flavivirus PCR (nach Moureau et al. 2007) gab es positive Ergebnisse in 22 Moskitopools sowie in 43 Pools der Zellkultur. Die positiven Ergebnisse der Moskitopools ließen sich in drei Gruppen (Contigs) einteilen. Durch den Vergleich der Sequenzinformationen mit der NCBI Datenbank war eine Ähnlichkeit zwischen 60 und 98% zu den insektenrestringierten Flaviviren erkennbar.

Es wurden 17 Sequenzen mit einer Identität von 98% zu *Culex* Flavivirus gefunden. Weiterhin wurden zwei neue Flavivirus-Spezies, Kumasi-ISF-A und Kumasi-ISF-B genannt, entdeckt.

Jedoch konnte kein humanpathogenes Flavivirus, wie z.B. WNV, YFV oder DENV, nachgewiesen werden. Der Nachweis von WNV wäre zu erwarten gewesen, da eine Seroprävalenz von ca. 28% gegen WNV in der erwachsenen Bevölkerung in Ghana vorliegt (Wang et al. 2009) und auch die beschriebene Gattung *Culex* als Hauptvektor in dieser Arbeit gefangen wurden. Eine Isolierung von WNV aus Moskitos in Ghana wurde bislang noch nicht beschrieben.

Für DENV und YFV Infektionen ist bekannt, dass sie hauptsächlich in der Regenzeit auftreten (Li 1985 et al., Jentes et al. 2010, Gubler 2004, Monath und Vasconcelos

2015). Da die Fangperiode der Moskitos in dieser Arbeit jedoch in der Trockenzeit lag, könnte dies der Grund für die negativen Ergebnisse sein. Zudem ist die letzte YFV Epidemie in Ghana 2003 beschrieben worden und es gibt ein recht flächendeckendes Impfprogramm (Monath und Vasconcelos 2015).

In der Gesamtzahl der gefangenen Moskitos, zeigte sich eine recht niedrige Anzahl von *Aedes* Moskitos. Gefangen wurden 19 Individuen in 5 Wochen, dieses entspricht 3,8 Moskitos pro Woche. Im Vergleich wurden an der Elfenbeinküste in einem Zeitraum von 20 Wochen 169 *Aedes* Moskitos gefangen, was 8,45 Individuen pro Woche entspricht. Auch die geringere Anzahl an Moskitos und somit geringerer geeigneter Vektor könnte die negativen Ergebnisse bezüglich YFV und DENV erklären.

Die Proben wurden zudem lediglich mit einer generischen PCR getestet (Moureau et al. 2007), die nicht so sensitiv ist wie eine spezifische *nested* PCR. Infektionen in denen das Virus nur einen geringen Titer aufweist, und es daher nur wenig viralen Genomkopien in der Moskitoprobe gibt, sind möglicherweise unter diesen Bedingungen schwer zu detektieren.

Bisher sind zahlreiche insektenspezifische Flaviviren bekannt, die ausschließlich Moskitos infizieren und nicht auf Vertebraten übertragen werden (Blitvich und Firth 2015, Huang et al. 2014). Die phylogenetischen Analysen teilen die insektenspezifischen Flaviviren in zwei Hauptgruppen: in *Culex*-assoziierte Flaviviren und *Aedes*-assoziierte Flaviviren (Cook et al. 2012, Hoshino et al. 2009). Die Daten dieser Arbeit stimmen damit überein. Der viruspositive Pool mit Nachweis von Kumasi-ISF-A welcher ausschließlich *Aedes* Moskitos enthält, ordnet sich phylogenetisch bei den *Aedes* Flaviviren ein. Die Pools, positiv auf *Culex flavivirus*, enthalten ausschließlich *Culex* Moskitos, was ebenfalls zur Speziesassoziation passt. Gemischte Pools sind in dieser Arbeit *Aedes* assoziiert und ordnen sich auch hier ein.

Kumasi-ISF-A gruppiert sich bei den insektenspezifischen Flaviviren mit einer Ähnlichkeit von 79 % neben CFAV an. CFAV wurde erst 2006 erstmals aus Moskitos in Südamerika isoliert (Cook et al. 2006). Als Vektoren wurden bisher *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* sowie *Cx. spezzii* beschrieben. In dieser Arbeit wurde Kumasi-ISF-A ebenfalls aus dem Pool, welcher aus *Aedes spezzii* bestand, isoliert. Die Pools

bestehend aus *Culex* Moskitos blieben in dieser Arbeit negativ. In der Arbeit von Cook et al. wurde bezüglich *Culex* keine Speziesenteilung beschrieben. Bereits vor mehr als 30 Jahren wurde während Laboruntersuchungen ein CPE auf *Aedes albopictus* Zellen beobachtet, nachdem ein Überstand einer *Aedes aegypti* Zellkultur hinzugegeben wurde. Die weiteren Untersuchungen des infektiösen Überstandes brachten den ersten Nachweis von CFAV isoliert aus der Zellkultur (Stollar und Thomas 1975). Ein Wachstum in der Zellkultur wurde auf der Insektenzelllinie C3/36 beschrieben (Cook et al. 2006). Ein Wachstum in der Zellkultur gelang in dieser Arbeit nicht (siehe 3.3).

Kumasi-ISF-B zeigt zum Menghai Flavivirus eine 77 % ige Ähnlichkeit und gruppiert sich bei den *Aedes* assoziierten Moskitos ein. In einer Screeningstudie in China 2010 wurde Menghai Flavivirus erstmals beschrieben (Zhang et al. 2017). Isoliert wurde MFV aus einem Pool bestehend aus *Ae. albopictus*, nach erfolgreicher Zellkultur auf C6/36 Zellen. Die Pools in denen Kumasi-ISF-B nachgewiesen wurde, waren gemischte Moskito Pools mit *Aedes*-, *Stegomyia*-, *Mansonia*- aber auch *Culex*-Arten. Die genaue Wirtsspezifität von Kumasi-ISF-A und -B kann noch nicht benannt werden.

In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Entdeckung und Charakterisierung neuartiger insektenspezifische Viren (ISV) vor allem im Genus *Flavivirus* (Familie *Flaviviridae*), drastisch zugenommen, bedingt durch die Fortschritte in den verfügbaren Methoden zum Nachweis von Viren (Guzman et al. 2018, Blitvich und Firth 2015). Insektenspezifische Flaviviren (ISF) zeigen eine weltweite Verbreitung.

Die ISFs werden in zwei Gruppen unterteilt. Die als erstes beschriebenen klassischen ISFs (cISF) und die zweifach-Wirt assoziierten insektenspezifische Flaviviren (englisch *dual-host affiliated*, dISF). In den letzten zehn Jahren wurden diverse neue cISF weltweit beschrieben (Blitvich und Firth 2015). In die cISF gruppieren sich auch die *Culex* Flaviviren (CxFV) welche in den Jahren 2003 – 2004 erstmals in Japan und Indonesien beschrieben wurden (Hoshino et al. 2007). Im Verlauf konnten weitere CxFV aus *Culex* Spezies aus Argentinien, Brasilien, China, Guatemala, Mexiko, Taiwan, Trinidad, Uganda und den USA isoliert werden (Goenaga et al. 2014, Machado et al. 2012, Huanyu et al. 2012, Morales-Betoulle et al. 2008, Saiyasombat et al. 2010, Chen et al. 2013, Kim et al. 2009, Cook et al. 2009). Die in dieser Arbeit isolierten *Culex* Flaviviren sind die ersten beschriebenen aus Ghana.

Bisher wurden als Vektoren Moskitos der Spezies *Cx. pipiens* und *Cx. quinquefasciatus* beschrieben (Blitvich und Firth 2015, Goenaga et al. 2014, Hoshino et al. 2007, Kim et al. 2009). In einer Studie aus Uganda konnte erstmals auch CxFV aus Moskitos der Spezies *Mansonia africana* isoliert werden (Cook et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde CxFV aus 17 Pools isoliert. In den Pools liegen neben den als Vektor bekannten *Cx. pipiens* und *Cx. quinquefasciatus* auch Moskitos der Spezies *Cx. nebulosus*, *Cx. terzii*, *Cx. theileri*, *Cu. cinereus* sowie *Cx. eumelanomyia horrideus* vor. Diese wurden bisher in der Literatur nicht als Vektoren beschrieben.

Da noch keine Sequenzierung der PCR positiven Einzelmoskitos stattgefunden hat, kann über die genaue Prävalenz keine Aussage gemacht werden. Für eine genauere Auswertung müssen die Pools, bestehend aus 20 Moskitos, in ihre Individuen aufgelöst werden. Erst dann kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob ein Mosquito oder vielleicht auch alle 20 Moskitos infiziert waren. Dann könnte auch eine Aussage über die Moskitospezies der infizierten Moskitos getroffen werden. Für das MFV wurde bisher *Aedes albopictus* als Vektor beschrieben (Zhang et al. 2017). Drei der Pools mit Nachweis von Kumasi-ISF-B (Pool 3, 4 und 58) mit Ähnlichkeit zum MFV sind *Aedes* assoziiert, beinhalten jedoch kein *Aedes albopictus*, sodass neben *Aedes* auch weitere Moskitospezies als Vektor fungieren müssten. Auch bei den in dieser Arbeit isolierten *Culex* Flaviviren bestanden die PCR-positiven Pools aus weiteren *Culex* spezies als bisher für CxFV publiziert. Eine Infektion von bisher nicht beschriebenen Moskitospezies scheint somit vorzuliegen. Diese Ergebnisse geben Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen der Einzelmoskitos.

Bisher liegt nur eine sehr kurze Genomsequenz der Flaviviren von 162 nt vor. Eine Sequenzierung größerer Genombereiche oder eine Vollgenomsequenzierung sollte durchgeführt werden, um einen genaueren Überblick und eine genauere Charakterisierung dieser vermutlich neuartigen Viren zu erhalten. Auch sollten die noch nicht sequenzierten Zellkulturpools weiterbearbeitet werden und es sollte eine Realtime-Time PCR und evtl. eine Wachstumskinetik der Zellkultur erfolgen. Damit können genauere Aussagen über die Kumasi Flaviviren getätigt werden. Die Auflösung der Pools und die dann mögliche Untersuchung der einzelnen Moskitos kann dann Auskunft über die Abundanz, Diversität und Prävalenz der Erreger geben.

#### 4.4 Versuche zu Bunyaviren

Die Familie der *Bunyaviridae* ist eine der größten Virusfamilien und umfasst eine extrem diverse Gruppe an durch Moskitos übertragenen Viren, wobei von mehr als 60 Mitgliedern innerhalb der Familie, Krankheiten beim Menschen, Tieren oder Pflanzen beschrieben wurden (Knipe et al. 2006, Elliott 2013).

Die Moskitopools, wie auch die CPE positiven Zellkulturüberstände, wurden mittels einer generischen PCR auf Phleboviren und Goukoviren (designed durch AG Junglen, Institut für Virologie am UK in Bonn), sowie Orthobunyaviren und Herbeviren (Junglen et al. 2009) getestet. Dieses Screening sollte erste Eindrücke liefern, ob Bunyaviren in Ghana vorkommen und gegebenenfalls in welchen Moskitospezies. Da in der benachbarten Elfenbeinküste eine Infektion von Moskitos mit Gouléako Virus, sowie Herbert Virus beschrieben wurde, war die Chance sehr hoch, dass sich diese oder ähnliche Viren auch in Ghana finden lassen (Marklewitz et al. 2011, Junglen et al. 2011).

##### 4.4.1 Nachweis von Herbert Virus in Ghana

Insgesamt wurden in 28 Pools virale Sequenzen von Bunyaviren gefunden. In sechs von 62 Pools (Infektionsrate 9,7 %) wurde das Herbert Virus (Familie *Peribunyaviridae*) nachgewiesen, in 25 Pools zwei neue Viren, KNUST-Aedes- und KNUST-Culex Virus (Familie *Phenuiviridae*). Von den sechs positiven Pools mit dem HEBV wurden zur genaueren Analyse des Ergebnisses in die jeweiligen Einzelmoskitos untersucht. Insgesamt waren 14 der 60 (1,1 %) Moskitos mit Herbert Virus infiziert. Vergleichbare Ergebnisse von der Elfenbeinküste zeigten eine Infektionsrate mit HEBV von 6,5 % (28/432 Pools, Junglen et al., 2009; Marklewitz et al. 2011). Ein erster Eindruck lässt eine Ausbreitung dieses Virus in Ghana möglich erscheinen. Zuvor wurde der Nachweis von HEBV an der Elfenbeinküste sowie in Korea beschrieben (Marklewitz et al. 2013, Chung et al. 2014). Das Herbert Virus konnte bisher aus verschiedenen Moskitospezies, z. B. *Culex*, *Anopheles* und *Uranotaenia* isoliert werden (Junglen et al. 2009). Das Screening der Einzelmoskitos auf HEBV zeigt in der vorliegenden Arbeit eine Infektion in drei *Culex* Spezies: *Culex nebulosus*, *Culex pipiens* und *Culex quinquefasciatus*. Von den Moskitogenera *Anopheles* und *Uranotaenia* wurden in der gesamten Fangperiode lediglich zwei bzw. ein Moskito gefangen. Zudem wurden *Anopheles*- und *Uranotaenia*

Moskito nur im Botanischen Garten gefangen. Bei einer höheren Individuenzahl der beiden weiteren Vektoren, *Anopheles* und *Uranotaenia*, könnte eine Steigerung der Infektionsrate aufgezeigt werden.

In den vergleichenden Publikationen wurde ein deutlicher Anstieg in der Virushäufigkeit von Primärregenwald zu menschlich modifizierten Gebieten nachgewiesen (Junglen et al. 2009). Das höhere Vorkommen in urbanen Gebieten lässt sich auch aus dieser Arbeit entnehmen. Von insgesamt 14 infizierten Moskitos wurden neun im Wohngebiet und lediglich fünf im Botanischen Garten gefangen.

#### 4.4.2 Detektion zweier neuer insektenspezifischer Viren aus der Familie *Phenuiviridae* aus Ghana

Insgesamt wurden in 25 Pools (Infektionsrate 40,3 %, 25/62) Phasi-ähnliche Viren detektiert. Die neuen Phenuiviren aus Kumasi, benannt KNUST-Aedes Virus und KNUST-Culex Virus, teilen sich in zwei Spezies mit einer recht geringen Ähnlichkeit von 73 % (auf AS Ebene) zueinander auf. Im Vergleich der Nukleotidsequenzen mit NCBI zeigt sich für beide Viren eine Ähnlichkeit zu beschriebenen *Phasiviren*. Der Vergleich von Kumasi-Culex Virus zeigt eine 94 % Ähnlichkeit zum Wutai Moskito Phasivirus, Kumasi-Aedes Virus 98 % zum Phasi charoen-like Phasivirus. Das Genus *Phasivirus* wurde erst 2016 neu als eigenständiges Genus in der Familie *Phenuiviridae* klassifiziert und beinhaltet drei Spezies: Badu Phasivirus, Phasi charoen-like Phasivirus und Wutai Moskito Phasivirus. Erst in den Jahren zuvor wurden sowohl das Wutai Moskito Phasivirus wie auch das PCLV aus Tiefensequenzier-Screenings aus Thailand und China beschrieben (Chandler et al. 2014, Li 2015). Eine Wirtsspezifität für Wutai Moskito Phasivirus wurde bisher nicht beschrieben. In Thailand wurden 2008 über einen kurzen Zeitraum von 24 Stunden 25 Moskitos der Spezies *Ae. aegypti* gefangen und zeigten eine Infektion mit dem PCLV (Chandler et al. 2014). Die PCR positiven Pools dieser Arbeit mit Ähnlichkeit zum PCLV bestehen aus gemischten Pools inklusive Moskitos der Genera *Aedes* und *Stegomyia*. Ein Wachstum des Virus in der Zellkultur konnte bislang in *Ae. aegypti* Zellen (Aag2), jedoch nicht in Zellkultur bestehend aus *Ae. albopictus* Zellen wie C6/36 aufgezeigt werden (Schultz et al. 2018). Dieses kann das negative Ergebnis der Zellkultur auf Phenuiviren in dieser Arbeit erklären, da lediglich die Zelllinie C3/36 verwendet wurde.

Zur genaueren Einordnung und Charakterisierung der Viren Kumasi-Culex-, und Kumasi-Aedes Virus, sollte eine Verlängerung des Genombereiches oder eine Vollgenomsequenzierung zur Darstellung des Genoms mit den drei Segmenten (L-, M- und S-Segment) durchgeführt werden.

Die PCR positiven Pools wurden in ihre Individuen aufgelöst und einzeln mit der generischen PCR getestet. Insgesamt wurden 146 positive Moskitos identifiziert. Sehr eindrücklich ist die Verteilung der Moskitos von 46 Individuen im Botanischen Garten und mehr als doppelt so vielen infizierten Moskitos als in der Wohngegend mit 100 Individuen. Hier dominieren wie in 3.2.4.1 beschrieben die Culex Arten, die bevorzugt an Menschen saugen und vom Menschen geschaffenes Habitat mit wassergefüllten Gläsern, Töpfen und mangelhafter Entwässerung für die Eiablage nutzen (Opoku und Ansa-Asare 2007, Aigbodion 2013). Zudem zeigte sich hier eine deutlich höhere Populationsdichte der Moskitos im Vergleich zum Botanischen Garten, was als Ergebnis mit Daten aus der Elfenbeinküste korreliert.

In der benachbarten Elfenbeinküste wurde GOLV mit einer Prävalenz von 6,5 % (28/432 Pools) nachgewiesen. In Ghana konnte kein Nachweis von GOLV oder anderen bekannten Phleboviren gelingen. Mehrere Überlegungen können angestellt werden, um das Ausbleiben einer Infektion auf den Zelllinien und innerhalb der Pools zu erklären. Es ist denkbar, dass durch die hohe genetische Variabilität der Viren, die genutzten generischen PCR Primer für Phleboviren und GOLV in dieser Arbeit keine exakten Bindungsstellen hatten und somit eine mögliche Infektion übersehen wurde. Weiterhin ist der in dieser Arbeit recht hohe Verdünnungsfaktor von 1:20 der einzelnen Moskitos in den Pools zu bedenken. Zu Beginn der Arbeit wurden jeweils 20 Moskitos zur einfacheren Handhabung zu einem Pool zusammengefasst. Es ist möglich, dass durch das geringe Infektionsvolumen eine zu geringe Menge an replikationsfähigen Viren vorhanden war. In Studien mit positiven Infektionsversuchen wurden 1:10 Verdünnungen benutzt (Marklewitz et al. 2011 und 2013).

Gouleako Virus und Herbert Virus zeigten eine hohe Prävalenz von 6,5 % in der Elfenbeinküste (Junglen et al., 2009; Marklewitz et al. 2011) und es wäre daher zu vermuten gewesen, dass auch das Gouleako Virus in Ghana vorkommt.

#### 4.5 Anzuchtversuche von Viren aus Moskitos in der Zellkultur

Blinde Isolationsversuche von Viren in Zellkultur bieten die Möglichkeit unspezifisch Viren detektieren zu können. Die Viren können in Zellkultur angereichert werden und die Genome anschließend über sequenzunabhängige Verfahren, wie beispielsweise Next Generation Sequenzierung, sequenziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten aus allen Proben Viren in Zellkultur isoliert werden. Alle 62 Pools erzeugten einen CPE, 47 Pools sowohl mit dem filtriertem Überstand und im AB/AM Ansatz. Im Ansatz AB/AM induzierten 52/62 Pools (84 %) einen CPE, steril filtriert sogar 57/62 (92 %). Dies ist eine außergewöhnlich hohe Isolierungsrate. Andere Studien zeigen Isolierungsraten zwischen 1 und 40% (Junglen et al., 2009; Kopp et al., 2013; Zirkel et al., 2011; Marklewitz et a., 2015).

Insgesamt hängt der Erfolg der Virusanzucht von mehreren unterschiedlichen Faktoren ab. Der bedeutsamste ist hierbei die Wahl der Zelllinie. Die Insektenzelllinie C6/36 ermöglicht vielen Arboviren eine Replikation durch einen Defekt im exogenen RNA-Interferenz (RNAi) Signalweg (Brackney et al. 2010). Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass es für viele vektorgebundenen Viren eine Vektorspezifität gibt und die Wahl der Zelllinie entscheidend ist (*Medically Important Mosquitoes*: <http://wrbu.si.edu>).

Von den CPE-positiven Zellkulturüberständen erbrachte lediglich die generische Flavi-PCR ein positives Ergebnis. Von 62 Pools waren 43 Pools mit Flaviviren infiziert (Infektionsrate 69 %). Aus diesen positiven Pools wurden zur weiteren Sequenzierung exemplarisch die ersten 23 Pools herangezogen. 17 der 23 Pools zeigten bereits ein positives Muster in der Gelelektrophorese und im Vergleich mit NCBI den Nachweis von Culex Flavivirus. Der direkte Vergleich der Zellkultur mit den Moskitopools zeigte identische Viren, sodass Culex flavivirus erfolgreich isoliert wurde. Kumasi-ISF-A und Kumasi-ISF-B konnten nicht isoliert werden. Jedoch zeigten auch die vier Pools, mit Nachweis dieser beiden Viren, ein positives Bandensignal im Gel. Die Sequenz zeigte im Vergleich ebenfalls Culex flavivirus. Möglicherweise waren diese Pools mit beiden Viren infiziert und in der Zellkultur zeigte sich eine höhere Viruslast des Culex flavivirus mit deutlich stärkerem Wachstum.

Im Verlauf der Arbeit konnte leider nicht herausgefunden werden welche weiteren Viren in Zellkultur isoliert wurden. Da die infizierten Zellkulturen unterschiedliche cytopathische

Effekte ausbildeten, ist davon auszugehen, dass verschiedene Viren isoliert wurden. Es wird vermutet, dass es sich hier um bisher unbekannte Viren handelt. Das Genom, der in den infektiösen Zellkulturüberständen befindlichen Viren, soll mittels Next Generation Sequencing sequenziert werden.

#### 4.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Methode der Probensammlung, die morphologische Identifizierung und die Untersuchung der Moskitos auf Virusinfektionen erfolgreich waren.

In dieser Studie wurden neue Phenui- und Flaviviren gefunden. Die Vollgenome dieser Viren sollen sequenziert und die Viren charakterisiert werden. Zudem kann überlegt werden, ob sich diese Viren als Modellviren zur Untersuchung von ökologischen Fragestellungen eignen.

Besonders hervorzuheben ist, dass in dieser Arbeit aus allen der insgesamt 62 Pools Viren in Zellkultur isoliert werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um bisher unbekannte Viren handelt. Die Genome der Viren sollen im Anschluss innerhalb der Arbeitsgruppe sequenziert und die Viren charakterisiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Diese Arbeit sollte einen Eindruck über die genetische Diversität an moskitoassoziierten Viren in Kumasi, Ghana, vermitteln. Daten hierzu lagen bisher nicht vor. Hierzu wurden an 26 Fangtagen im Februar und März 2011 insgesamt 1.622 Moskitos im Botanischen Garten und in einem Wohngebiet auf dem Campusgelände der Universität in Kumasi gefangen. Die Moskitos wurden soweit möglich bis zur Art bestimmt. Für die nachfolgenden Schritte wurden die Moskitos einzeln homogenisiert und anschließend in 20er Pools zu insgesamt 62 Pools zusammengefasst. Die Proben wurden zum einen mit generischen PCR-Assays auf Infektionen mit Flavi-, Bunya- Alpha- und Mesoniviren untersucht. Zum anderen wurde versucht in den Proben eventuell vorhandene infektiöse Viruspartikel in Zellkultur anzuzüchten.

Es wurden 25 Moskitospezies, die zu 12 Genera gehören, gefangen. Dies entspricht 54% der bisher für Ghana beschriebenen Moskitospezies. Es wurden zwei bisher unbekannte insektenspezifische Flaviviren detektiert, die als Kumasi-ISF-A und Kumasi-ISF-B bezeichnet wurden. Kumasi-ISF-A wie auch Kumasi-ISF-B gruppieren mit insektenspezifischen Flaviviren, die aus *Aedes* Moskitos stammen. Außerdem wurden Stämme von Culex-Flavivirus nachgewiesen, welche bisher nur in Moskitos aus Asien, Amerika und Ostafrika gefunden wurden. Weiterhin wurden zwei bisher unbekannte insektenspezifische Phasiviren (Familie *Phenuiviridae*) in 25 Pools detektiert. Die Sequenzen wiesen untereinander eine genetische Distanz von 65 % auf und wurden als KNUST-Aedes Virus und KNUST-Culex Virus bezeichnet. Als weiteres Bunyavirus wurde Herbert Virus (Familie *Peribunyaviridae*, Genus *Herbevirus*) in sechs Pools nachgewiesen. Besonders hervorzuheben ist, dass aus allen 62 Pools infektiöse Viren in Moskitozellen isoliert werden konnten. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte nicht herausgefunden werden um welche Viren es sich bei den Isolaten handelt. Da unterschiedliche cytopatische Effekte zu beobachten waren, ist davon auszugehen, dass verschiedene, bisher unbekannte Viren isoliert wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Moskitos aus Ghana mit einer Vielzahl an bisher unbekanntem Viren infiziert sind. In dieser Arbeit konnten neue insektenspezifische Viren identifiziert werden. Inwiefern es sich bei den infektiösen Zellkulturüberständen um human- oder tierpathogene Viren handelt, ist Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Graphische Darstellung eines Alphaviruspartikels .....	19
Abb. 2:	Schematische Darstellung eines Flaviviruspartikels .....	21
Abb. 3:	vorgeschlagene Klassifikation der GB Viren innerhalb der Familie <i>Flaviviridae</i> .....	24
Abb. 4:	Graphische Darstellung eines Bunyaviruspartikels .....	26
Abb. 5:	Karte von Ghana im Kontext zu den umliegenden afrikanischen Ländern. Die Vergrößerung zeigt Ghana mit dem Fokus auf Kumasi sowie eine Vergrößerung mit Lupeneffekt auf die Lage der Fangpunkte im Stadtgebiet von Kumasi .....	33
Abb. 6:	Übersichtskarte der beiden unterschiedlichen Gebiete, gestörte (disturbed) und ungestörte (undisturbed) Fläche des Botanischen Garten auf dem Campusgelände der Universität Kumasi (KNUST) .....	34
Abb. 7:	Satellitenbild der beiden Fanggebiete auf dem Universitätsgelände KNUST Kumasi/Ghana .....	45
Abb. 8:	Verwendete Moskitofallentypen CDC <i>Light Trap</i> und BG <i>Sentinel Trap</i> ® ..	46
Abb. 9:	Verteilung der gefangenen Moskitos auf Genuslevel im Botanischen Garten und im Wohngebiet .....	68
Abb. 10:	Abundanz gefangener <i>Stegomyia</i> und <i>Culex</i> Arten gezeigt für beide Fangorte .....	71
Abb. 11:	Phylogenetische Analyse der in dieser Studie gefundenen Flaviviren zu etablierten insektenspezifischen Flaviviren mittels PHYML .....	76
Abb. 12:	Schematische Darstellung der PCR-Varianten zur Sequenzierung der phleboähnlichen Viren KNUST-Aedes Virus und KNUST-Culex Virus ....	80
Abb. 13:	Alignment der Motive in der dritten konservierten Region der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Premotif A, Motif A, B, C, D, E) und den KNUST-Culex Virus P15-Ghana2011 und KNUST-Aedes Virus P02-Ghana2011 sowie Vertretern der Bunyavirus Genera .....	81
Abb. 14:	Maximum likelihood Stammbaum von Phasiviren und repräsentativen Vertretern der Familie <i>Phenuiviridae</i> .....	82
Abb. 15:	Phylogenetische Analyse der ghanaischen Herbert Virus Stämme .....	87
Abb. 16:	Vereinfachte Darstellung der PCR-Varianten zur Sequenzierung von orthobunyaähnlichen Viren .....	88
Abb. 17:	Schemazeichnung der PCR-Varianten zur Detektion der Herbert-ähnlichen Viren in Moskitos .....	90
Abb. 18:	CPE-positive Zellkulturansätze .....	91
Abb. 19:	CPE auf C6/36 Zellen .....	92
Abb. 20:	Repräsentative Darstellung der nested PCR der PAN Flavi .....	93
Abb. 21:	CPE von M0088-GH2011 auf C6/36 nach sechs Tagen .....	94

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Standard cDNA-Synthese Protokoll mit SuperScript™ III RT und Random-Hexamer Primern .....	52
Tab. 2:	Spezifische cDNA Synthese Protokoll SuperScript™ III RT und spezifische Primer .....	53
Tab. 3:	PCR-Protokoll und Cyclor Programm .....	54
Tab. 4:	PCR Protokoll der <i>nested</i> -PCR und Programm .....	55
Tab. 5:	Protokoll der Touch-Down PCR und Cyclor Programm .....	55
Tab. 6:	<i>Real Time</i> PCR Protokoll und Programm .....	57
Tab. 7:	Verwendete Primer und Sonden .....	58
Tab. 8:	Protokoll der Refresh PCR und Programm .....	63
Tab. 9:	Protokoll der Klonierungsreaktion .....	64
Tab. 10:	Kolonie PCR Protokoll und Cyclor Programm .....	65
Tab. 11:	Anzahl der gefangenen Moskitos mit verschiedenen Lockmitteln .....	67
Tab. 12:	Anzahl gefangener weiblicher Moskitospezies in absoluten Werten (n) und in relativen Verhältnissen zu Fangeinheit (M/FE) aufgeteilt nach Fangort .....	69
Tab. 13:	Berechnung der Diversität an den beiden Fangorten anhand verschiedener mathematischer Größen .....	72
Tab. 14:	In dieser Arbeit identifizierte Flaviviren .....	74
Tab. 15:	Sequenzen mit Doppelpeaks .....	75
Tab. 16:	Detektierte neuartige Phleboviren .....	78
Tab. 17:	Viruspositive Moskitos der positiven Moskitopools .....	83
Tab. 18:	In Ghana identifizierte Stämme von Herbert Virus .....	89
Tab. 19:	Positive Ergebnisse der Flaviviren-Pools in der Zellkultur .....	116

**Tab. 19:** Positive Ergebnisse der Flaviviren-Pools in der Zellkultur. Auflistung der 43 positiven Pools in der Zellkultur mit Bandensignal im Agarosegel auf der korrekten Höhe

Pool	Spezies	Fangort		Bedingung filtriert AB/AM	
P01	Aed. lep. africana, Di. fascipalpis, Ae. spp	BG	WG	x	x
P02	Ae. spp., St. albopictus, St. ledgeri, St. soleatus	BG	WG	x	
P03	St. soleatus, St. spp., An. neo. salbaii, Ma. af. spp., Ma. spp., Ma. th. africana	BG	WG	x	x
P04	Cx. cx. argenteopunctatus, Cx. cx. cherleyi, Cx. cx. decens, Cx. cx. pipiens	BG	WG	x	
P05	Cx. cx. pipiens	BG	WG	x	x
P06	Cx. cx. pipiens	BG	WG	x	x
P07	Cx. cx. pipiens	BG	WG	x	x
P08	Cx. cx. pipiens	BG	WG	x	x
P09	Cx. cx. pipiens	BG	WG	x	x
P10	Cx. cx. pipiens, Cx. cx. quinquefasciatus	BG	WG	x	x
P11	Cx. cx. quinquefasciatus	BG	WG	x	
P12	Cx. cx. quinquefasciatus	BG	WG	x	x
P13	Cx. cx. quinquefasciatus	BG	WG	x	x
P14	Cx. cx. quinquefasciatus	BG	WG	x	x
P15	Cx. cx. quinquefasciatus, Cx. cx. spp., Cx. cx. terzii, Cx. cx. theileri, Cx. cx. cinereus, Cx. cx. nebulosus	BG	WG	x	
P16	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P17	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P18	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P19	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P20	Cx. cu. nebulosus	BG			x
P21	Cx. cu. nebulosus	BG	WG		x
P22	Cx. cu. nebulosus	BG		x	x
P23	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P24	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P25	Cx. cu. nebulosus	BG		x	x
P26	Cx. cu. nebulosus	BG		x	x
P27	Cx. cu. nebulosus	BG		x	x
P28	Cx. cu. nebulosus, Cu. cx. quinquefastiatus	BG	WG	x	x
P29	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P31	Cx. cu. nebulosus	BG			x
P32	Cx. cu. nebulosus	BG		x	x
P33	Cx. cu. nebulosus	BG		x	x

P37	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P38	Cx. cu. nebulosus	BG		x	x
P43	Cx. cu. nebulosus	BG		x	x
P50	Cx. cu. nebulosus	BG	WG	x	x
P51	Cx. cu. nebulosus, Cu. eu. horrideus	BG	WG	x	
P54	Cx. eu. horrideus, Cu. eu. wigglesworthii	BG	WG	x	x
P56	Cx. eu. horrideus	BG		x	x
P57	Cx. eu. horrideus, Cx. cx. spp, Cx. cx. pipiens	BG	WG	x	x
P59	Cx. spp.	BG	WG	x	x
P61	Cx. spp., Mi. pallida	BG		x	x
P62	Mi. pallida, Unknown, Ur. ps. spp., Cx cu. nebulosus, To. brevialpis, To. spp, Lu. spp., Cx. eu. wigglesworthii, Cx. cx. theileri	BG	WG	x	x

## 8. Literaturverzeichnis

Adam F, Digoutte JP. Virus d'Afrique (Base de Données). Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les Arbovirus et les Virus de Fièvres Hémorragiques (CRORA) Dakar, Institut Pasteur de Dakar: Sénégal 2005

Addo-Fordjour P, Anning AK, Atakora EA, Agyei PS. Diversity and distribution of climbing plants in a semi-deciduous rain forest, KNUST botanic garden, Ghana. *International Journal of Botany* 2008; 4:186-195

Adebote AD, Oniye JS, Ndams SI, Nache KM. The breeding of mosquitoes (diptera: Culicidae), in peridomestic containers and implication in yellow fever transmission in villages around Zaria, northern Nigeria. *J Entomol* 2006; 3:180-188

Afrane YA, Klinkenberg E, Drechsel P, Owusu-Daaku K, Garms R, Kruppa T. Does irrigated urban agriculture influence the transmission of malaria in the city of Kumasi, Ghana? *Acta Trop* 2004; 89:125-134

Aguirre AA, Tabor GM. Global factors driving emerging infectious diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1149:1-3

Aigbodion FI, Uyi OO. Temporal distribution of and habitat diversification by some mosquitoes (diptera: Culicidae) species in Benin city, Nigeria. *Journal of Entomology* 2013; 10

Amarasinghe A, Kuritsky JN, Letson GW, Margolis HS. Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis* 2011; 17

Appawu M, Dadzie S, Abdul H, Asmah H, Boakye D, Wilson M, Ofori-Adjei D. Surveillance of viral haemorrhagic fevers in Ghana: Entomological assessment of the risk of transmission in the northern regions. *Ghana Medical Journal* 2006; 40

Appawu MA, Dadzie SK, Baffoe-Wilmot A, Wilson MD. Lymphatic filariasis in Ghana: Entomological investigation of transmission dynamics and intensity in communities served by irrigation systems in the upper east region of Ghana. *Tropical Medicine & International Health* 2001; 6: 511-516

Auguste AJ, Carrington CV, Forrester NL, Popov VL, Guzman H, Widen SG, Tesh RB. Characterization of a novel Negevirus and a novel Bunyavirus isolated from *Culex* (Culex) declarator mosquitoes in Trinidad. *The Journal of general virology* 2014; 2: 481

Barnett ED. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44: 850-856

Baron S, Schmaljohn AL, McClain D. Alphaviruses (togaviridae) and flaviviruses (flaviviridae). 1996

Barrett AD, Monath TP. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Advances in virus research* 2003; 61: 291-317

Bessaud M, Peyrefitte C, Pastorino B, Gravier P, Tock F, Boete F, Tolou H, Grandadam M. O'nyong-nyong Virus, Chad. *Emerging infectious diseases* 2006; 12:1248

Bhalala H, Arias JR. The Zumba™ mosquito trap and BG-Sentinel™ trap: novel surveillance tools for host-seeking mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2009; 25: 134-139

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Myers MF. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496: 504

Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C: the good boy virus?. *Trends in microbiology* 2012; 20: 124-130

Bird BH, Ksiazek TG, Nichol ST, MacLachlan NJ. Rift Valley fever virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2009; 234: 883-893

Blitvich B, Firth A. Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization. *Viruses* 2015; 7:1927-1959

Bolling B, Weaver S, Tesh R, Vasilakis N. Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses* 2015a; 7: 4911-4928

Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in parasitology* 2013; 29: 460-468

Brackney DE, Scott JC, Sagawa F, Woodward JE, Miller NA, Schilkey FD, et al. C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; 4: e856

Brinkmann A, Nitsche A, Kohl C. Viral metagenomics on blood-feeding arthropods as a tool for human disease surveillance. *International journal of molecular sciences*. 2016; 10: 1743.

Bukh J, Apgar C, Yanagi M. Toward a Surrogate Model for Hepatitis C Virus: An Infectious Molecular Clone of the GB Virus-B Hepatitis Agent. *Virology* 1999; 262: 470-478

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 531-45

Calisher CH, Gould EA. Taxonomy of the virus family flaviviridae. *Advances in Virus Research* 2003; 59: 1-20

Caminade C, Ndione A, Kebe CMF, Jones E, Danuor S, Tay S, et al. Mapping rift valley fever and malaria risk over west africa using climatic indicators. *Atmospheric Science Letters* 2011; 12: 96-103

Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *The Lancet infectious diseases* 2002; 2: 519-529

Carey DE, Causey OR, Reddy S, Cooke AR. Dengue viruses from febrile patients in Nigeria, 1964-68. *The Lancet* 1971; 297: 105-106

Cavrini F, Gaibani P, Pierro A, Rossini G, Landini M, Sambri V. Chikungunya: an emerging and spreading arthropo-borne viral disease. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2009; 3: 744-752

Chandler JA, Thongsripong P, Green A, Kittayapong P, Wilcox BA, Schroth GP, Bennett SN. Metagenomic shotgun sequencing of a Bunyavirus in wild-caught *Aedes aegypti* from Thailand informs the evolutionary and genomic history of the Phleboviruses. *Virology* 2014; 464, 312-319

Chen YY, Lin JW, Fan YC, Tu WC, Chang GJ, Chiou SS. First detection of the Africa/Caribbean/Latin American subtype of *Culex flavivirus* in Asian country, Taiwan. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 36: 387-396

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003

Chua K, Bellini W, Rota P, Harcourt B, Tamin A, Lam S, Ksiazek T, Rollin P, Zaki S, Sheih W-J. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 2000; 288: 1432-1435

Chung HC, Van Giap Nguyen DG, Park CH, Kim AR, Moon HJ, Park SJ, Park BK. Gouléako and Herbert viruses in pigs, Republic of Korea, 2013. *Emerging infectious diseases* 2014; 20: 2072

Clements A, Pfeiffer D, Otte V, Otte M. A Rift Valley fever atlas für Africa. *Preventive veterinary medicine* 2007; 82: 72-82

Collins LE, Blackwell A. The biology of Toxorhynchites mosquitoes and their potential as biocontrol agents. *Biocontrol News and Information* 2000; 21: 105N-116N

Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, De Lamballerie X. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *Journal of General Virology* 2006; 4: 735-748

Cook S, Moureau G, Harbach RE, Mukwaya L, Goodger K, Ssenfuka F, de Lamballerie X. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of Culex flavivirus (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *Journal of General Virology* 2009; 90: 2669-2678

Cook S, Moureau G, Kitchen A, Gould EA, de Lamballerie X, Holmes EC, Harbach RE. Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *Journal of General Virology* 2012; 93: 223-234

Crabtree MB, Nga PT, Miller BR. Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Archives of virology*, 2009 154 (5):857-860

Crabtree MB, Sang RC, Stollar V, Dunster LM, Miller BR. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Archives of virology* 2003 148: 1095-1118

Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, de Lamballerie X. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *Journal of General Virology* 2004; 85: 1971-1980

Cunningham AA. A walk on the wild side—emerging wildlife diseases. *Bmj* 2005; 331: 1214-1215

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 2000; 287: 443-449

Daubney R, Hudson JR, Garnham PC. Enzootic hepatitis or Rift Valley fever. An undescribed virus disease of sheep cattle and man from East Africa. *The Journal of Pathology* 1931; 34: 545-579

de Jong M, Simmons C, Thanh T, Hien V, Smith G, Chau T, Hoang D, Chau N, Khanh T, Dong V. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature medicine* 2006. 12 1203-1207

Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys: Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J. Exp. Med* 1967; 125: 673-687

Diallo M, Sall AA, Moncayo AC, Ba Y, Fernandez Z, Ortiz D, Weaver SC. Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2005; 73: 445-449

Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Lukashev AN, Gmyl A, Coutard B, Kallies R. Evidence for novel hepaciviruses in rodents. *PLoS pathogens* 2013; 9: e1003438

Drosten C, Günther S, Preiser W, Van Der Werf S, Brodt HR, Becker S, Berger A. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England journal of medicine* 2003; 348: 1967-1976

Duygu F, Kaya T, Baysan P. Re-Evaluation of 400 Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Cases in an Endemic Area: Is Ribavirin Treatment Suitable? *Vector-Borne and Zoonotic diseases* 2012; 12: 812-816

Dzodzomenyo M, Simonsen PE. Bancroftian filariasis in an irrigation project community in southern Ghana. *Tropical Medicine & International Health* 1999; 4: 13-18

Edwards FW. Mosquitoes of the Ethiopian region. III.-Culicine adults and pupae. *Mosquitoes of the Ethiopian Region. III.-Culicine Adults and Pupae* 1941

Elliott RM. *The bunyaviridae*. Springer Science & Business Media 2013

Encyclopedia of life - animals - plants - pictures & information; Available from: <http://eol.org/>. Accessed 10 February 2014

Enserink M. Tropical disease follows mosquitoes to Europe. *Science* 2007; 317: 1485-1485

Epstein JH, Prakash V, Smith CS, Daszak P, McLaughlin AB, Meehan G, Cunningham AA. Henipavirus infection in fruit bats (*Pteropus giganteus*), India. *Emerging infectious diseases* 2008; 14: 1309

Epstein JH, Quan PL, Briese T, Street C, Jabado O, Conlan S, et al. Identification of GBV-D, a novel gb-like flavivirus from old world frugivorous bats (*pteropus giganteus*) in bangladesh. *PLoS Pathogens* 2010; 6: e1000972

Esen RK, Amoyaw FP, Doku-Amponsah K. *Aedes (stegomyia)* mosquitoes in the ashanti region of ghana: Implications for yellow fever paucity. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 2013; 3: 131-143

Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, genetics and evolution* 2011; 11: 1577-1585

Ferguson N, Cummings D, Cauchemez S, Fraser C, Riley S, Meeyai A, Iamsirithaworn S, Burke D. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. *Nature* 2005; 437: 209-214

Firth C, Bhat M, Firth MA, Williams SH, Frye MJ, Simmonds P, Lee B. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *MBio* 2014; 5: e01933-14

Franco L, Di Caro A, Carletti F, Vapalahti O, Renaudat C, Zeller H, Tenorio A. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in west africa. *Euro Surveill* 2010; 15: 2-6

Geier M, Rose A, Grunewald J, Jones O. New mosquito traps improve the monitoring of disease vectors. *Int Pest Control* 2006; 48: 124-126

Ghana districts - A repository of all districts in the republic of Ghana; Available from: <http://www.ghanadistricts.com/region/>. Accessed 9 February 2014

Gillett JD. Mosquitos. Mosquitos 1971

Goenaga S, Fabbri CM, Garcia JB, Rondan JC, Gardenal N, Calderon GE, Enria DA, Levis SM. New strains of *Culex flavivirus* isolated in Argentina. *J. Med. Entomol.* 2014; 51: 900-906

Gould EA, Gallian P, De Lamballerie X, Charrel RN. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality!. *Clinical microbiology and infection* 2010; 16: 1702-1704

Grobbelaar AA, Weyer J, Leman PA, Kemp A, Paweska JT, Swanepoel R. Molecular epidemiology of Rift Valley fever virus. *Emerging infectious diseases* 2011; 17: 2270

Grywna K, Kupfer B, Panning M, Drexler JF, Emmerich P, Drosten C, Kümmerer BM. Detection of all species of the genus alphavirus by reverse transcription-pcr with diagnostic sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48:3386-3387

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews* 1998; 11: 480-496

Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 442

Gubler DJ. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 2004; 27: 319-330

Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research* 2002; 33: 330-342

Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet* 2015, 385(9966), 453-465

Guzman H, Contreras-Gutierrez MA, da Rosa APT, Nunes MR, Cardoso JF, Popov VL, Watts DM. Characterization of three new insect-specific flaviviruses: their relationship to the mosquito-borne flavivirus pathogens. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2018; 2: 410-419

Haas W, Krause G, Marcus U, Stark K, Ammon A, Burger R. Emerging infectious diseases. *Der Internist* 2004; 45: 684-692

Harbach R. Mosquito Taxonomic Inventory ([www.mosquito-taxonomic-inventory.info/](http://www.mosquito-taxonomic-inventory.info/)) 2015

Harbach RE. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): The foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Trop* 2011; 120: 1-14

Hayman DT, Suu-Ire R, Breed AC, McEachern JA, Wang L, Wood JL, Cunningham AA. Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS One* 2008; 3 (7):e2739.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research* 1996; 6: 986-994

Hörmansdorfer S. SARS - Pandemie und Emerging Disease. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2008; 3: 417-420

Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, Sawabe K. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 2007; 2: 405-414

Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology* 2009; 391: 119-129

<https://www.biogents.com/bg-sentinel/?lang=de#1483981755632-f378ab3a-b4df>. 2018

Huang YJS, Higgs S, Horne KM, Vanlandingham DL. Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses* 2014; 6: 4703-4730

Huanyu W, Haiyan W, Shihong F, Guifang L, Hong L, Xiaoyan G, Lizhi S, Rayner S, Aiqiang X, Guodong L. Isolation and identification of a distinct strain of *Culex* Flavivirus from mosquitoes collected in Mainland China. *Viol. J.* 2012; 9: e73

Huhtamo E, Uzcátegui NY, Siikamäki H, Saarinen A, Piiparinen H, Vaheri A, Vapalahti O. Molecular epidemiology of dengue virus strains from Finnish travelers. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 80

Hulst MM, Moormann RJ. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E (rns) and E2 of classical swine fever virus: E (rns) and E2 interact with different receptors. *Journal of General Virology* 1997; 78: 2779-87

ICTV home; Available from: <http://www.ictvonline.org/>. Accessed 24 February 2014 and February 2019

Jentes E, Pomeroy G, Gershman M, Hill D, Lemarchand J, Lewis R, Staples J, Tomori O, Wilder-Smith A, Monath T. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *The Lancet infectious diseases* 2011; 11: 622-632

Jentes ES, Robinson J, Johnson BW, Conde I, Sakouvougui Y, Iverson J, et al. Acute arboviral infections in Guinea, West Africa, 2006. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; 83: 388

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990-993

Junglen S, Kurth A, Kuehl H, Quan P-L, Ellerbrok H, Pauli G. Examining landscape factors influencing relative distribution of mosquito genera and frequency of virus infection. *EcoHealth* 2009; 6: 239-249

Junglen S. Evolutionary origin of pathogenic arthropod-borne viruses—a case study in the family Bunyaviridae. *Current opinion in insect science* 2016; 16: 81-86.

Jupp PG. Mosquitoes of southern Africa: Culicinae and Toxorhynchitinae. *Ekogilde Publishers*; 1996ah

Kim DY, Guzman H, Bueno RJr, Dennett JA, Auguste AJ, Carrington CV, Popov VL, Weaver SC, Beasley DW, Tesh RB. Characterization of Culex Flavivirus (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology* 2009; 386: 154–159

Kim JP, Fry KE. Molecular characterization of the hepatitis G virus. *Journal of viral hepatitis* 1997; 4: 77-79

Klinkenberg E, McCall PJ, Wilson MD, Amerasinghe FP, Donnelly MJ. Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana. *Malaria Journal* 2008; 7: 151

Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R, Matrin M. *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins (2007)

Kramer LD, Ebel GD. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Advances in Virus Research* 2003; 60: 187-232

Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *The Lancet Neurology* 2007; 6: 171-181

Kuno G, Chang GJJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. *Journal of virology* 1998; 72: 73-83

Lacaux JP, Tourre YM, Vignolles C, Ndione JA, Lafaye M. Classification of ponds from high-spatial resolution remote sensing: Application to Rift Valley Fever epidemics in Senegal. *Remote Sensing of Environment* 2007; 106: 66-74

Lafferty KD, Mordecai EA. The rise and fall of infectious disease in a warmer world. *F1000Research* 2016; 5

Lanford RE, Chavez D, Notvall L, Brasky KM. Comparison of tamarins and marmosets as hosts for GBV-B infections and the effect of immunosuppression on duration of viremia. *Virology* 2003; 311: 72-80

Li CF, Lim TW, Han LL, Fang R. Rainfall, abundance of aedes aegypti and dengue infection in selangor, malaysia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1985; 16: 560-568

Li CX, Shi M, Tian JH, Lin XD, Kang YJ, Chen LJ, Zhang YZ. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses *elife* 2015; 4; e05378

Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Karayiannis P. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-508

Lyima I, Ferguson H. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends in parasitology* 2009; 25: 189-196

Machado DC, Mondini A, dos Santos Santana V, Yonamine PT, Chiaravalloti Neto F, Zanotto PM, Nogueira ML. First identification of Culex flavivirus (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology* 2012; 55: 475–483

Mackenzie JS, Barrett ADT, Deubel V. The Japanese encephalitis serological group of flaviviruses: a brief introduction to the group. In *Japanese encephalitis and West Nile viruses* 2002 (pp. 1-10). Springer, Berlin, Heidelberg

Madani TA, Al-Mazrou YY, Al-Jeffri MH, Mishkhas AA, Al-Rabeah AM, Turkistani AM, Shobokshi O. Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 37: 1084-1092

Marklewitz M, Handrick S, Grasse W, Kurth A, Lukashev A, Drosten C, et al. Gouleako virus isolated from West African mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family Bunyaviridae. *Journal of virology* 2011; 85: 9227-9234

Marklewitz M, Zirkel F, Rwego IB, Heidemann H, Trippner P, Kurth A, Gillespie TR. Discovery of a unique novel clade of mosquito-associated bunyaviruses. *Journal of virology* 2013; 87: 12850-12865

Martha KA, Anne AM, Charles M, Julius, Lutwama J. The distribution of Mosquito (Diptera: Culicidae) activity in Zika Forest, Uganda. *Baraton Interdisciplinary Research Journal* 2014; 3: 19-27

Meyer C. Tropenmedizin – Infektionskrankheiten. Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, ecomed Medizin, Landyberg, 2. Auflage

Morales-Betoulle ME, Monzon Pineda ML, Sosa SM, Panella N, Lopez MR, Cordon-Rosales C, Komar N, Powers A, Johnson BW. *Culex flavivirus* isolates from mosquitoes in Guatemala. *J. Med. Entomol.* 2008; 45: 1187–1190

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molekulare Virologie*. Heidelberg Spektrum, Akademischer Verlag 2010. 3. Auflage

Monath T. Yellow fever as an endemic/epidemic disease and priorities for vaccination. *Bulletin-Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales* 2006: 99

Monath T. Yellow fever vaccine. *Expert review of vaccines* 2005; 4: 553-574

Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *Journal of Clinical Virology* 2015; 64: 160-173

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 7

Moureau G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, De Lamballerie X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2007; 7: 467-478

Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, Mushahwar IK. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *Journal of Virology* 1995; 69: 5621-5630

Nga PT, del Carmen Parquet M, Lauber C, Parida M, Nabeshima T, Yu F, et al. Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes. *PLoS Pathogens* 2011; 7: e1002215

Opoku AA, Ansa-Asare OD. The occurrences and habitat characteristics of mosquitoes in Accra, Ghana. *West African Journal of Applied Ecology* 2007; 11

Osei-Kwasi M, Dunyo SK, Koram KA, Afari EA, Odoom JK, Nkrumah FK. Antibody response to 17D yellow fever vaccine in Ghanaian infants. *Bulletin of the World Health Organization* 2001; 79: 1056-1059

Palacios G, Savji N, da Rosa AT, Guzman H, Yu X, Desai A, Tesh R. Characterization of the Uukuniemi virus group (Phlebovirus: Bunyaviridae): evidence for seven distinct species. *Journal of virology* 2013; 6: 3187-3195.

Panning M, Grywna K, Van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 416

Pedersen EM, Kilama WL, Swai ABM, Kihamia CM, Rwiza H, Kisumku UM. Bancroftian filariasis on pemba island, zanzibar, tanzania: An update on the status in urban and semi-urban communities. *Tropical Medicine & International Health* 1999; 4: 295-301

Peiris J, Yuen K, Osterhaus A, Stöhr K. The severe acute respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2431-2441

Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Veterinary research* 2010; 41: 61

Pielou E. *Ecological Diversity* (1975). Wiley-Interscience, New York

Quan P-L, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ, et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110: 8194-8199

Racaniello V. Emerging infectious diseases. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 113: 796

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of aedini (diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society* 2004; 142: 289-368

Reinert JF. The zoogeography of *Aedes (Diceromyia) theobaldi* (diptera: Culicidae). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa* 1970; 33: 129-141

Reisen WK. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Advances in virus research* 2003; 61: 139-184

Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: An outbreak in a temperate region. *The Lancet* 2007; 370: 1840-1846

Roiz D, Roussel M, Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J. Efficacy of mosquito traps for collecting potential West Nile mosquito vectors in a natural Mediterranean wetland. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2012; 86: 642-648

Rose A, Kröckel U, Bergbauer R, Geier M, Eiras ÁE. Der BG-sentinel, eine neuartige stechmückenfalle für forschung und überwachung. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 2006; 15: 345-348

Ryman KD, Klimstra WB. Host responses to alphavirus infection. *Immunological Reviews* 2008; 225: 27-45

Saiyasombat R, Dorman KS, Garcia-Rejon JE, Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Blitvich BJ. Isolation and sequence analysis of Culex flavivirus from Culex interrogator and Culex quinquefasciatus in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Arch. Virol.* 2010; 155: 983–986

Samuelsen H, Toé LP, Baldet T, Skovmand O. Prevention of mosquito nuisance among urban populations in Burkina Faso. *Social science & medicine* 2004; 59: 2361-2371

Schultz MJ, Frydman HM, Connor JH. Dual Insect specific virus infection limits Arbovirus replication in Aedes mosquito cells. *Virology* 2018; 518: 406-413

Shannon CE, Weaver W. The Mathematical Theory of Communication. Univ. Illinois Press 1949; 27: 379-423

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet infectious diseases* 2005; 5: 558-567

Sibley SD, Lauck M, Bailey AL, Hyeroba D, Tumukunde A, Weny G, Friedrich TC. Discovery and characterization of distinct simian pegiviruses in three wild African Old World monkey species. *PLoS One* 2014; 9: e98569

Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Mushahwar IK. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature medicine* 1995a; 1: 564-569

Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, Chalmers ML. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proceedings of the national academy of Sciences* 1995b; 92: 3401-3405

Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Simmonds P. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *Journal of General Virology* 2016; 97: 2894-2907

Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda<sup>1</sup>. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1940; 1: 471-492

Sodhi N, Ehrlich P. *Conservation biology for all*. Oxford University Press 2010; 314-317

Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: A review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus pegivirus within the family flaviviridae. *Journal of General Virology* 2011; 92: 233-246

Stollar V, Thomas VL. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology* 1975; 64: 367-377

Surtees G. Notes on the breeding habits of some culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southern Ghana. *Physiological Entomology* 1958; 33: 88-92

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 2011; 28: 2731-2739

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 1994; 22: 4673-4680

von Stebut E. Reisedermatosen. Springer Verlag 2015; 90-99

Walter reed biosystematics unit. Available from: <http://wrbu.org/>. Accessed 9 February 2014

Wang L, Shit Z, Zhang S, Field H, Daszak P, Eaton B. emerging infectious diseases 2006; 12: 1834-1840

Wang W, Sarkodie F, Danso K, Addo-Yobo E, Owusu-Ofori S, Allain J-P, Li C. Seroprevalence of west Nile virus in Ghana. *Viral Immunology* 2009; 22: 17-22

Wang Y, Dai Z, Cheng H, Liu Z, Pan Z, Deng W, et al. Towards a better understanding of the novel avian-origin H7N9 influenza A virus in China. *Scientific Reports* 2013; 3

Webster R, Govorkova E. H5N1 Influenza – Continuing evolution and spread. *New England Journal of Medicine* 2006; 355: 2174-2177

Weingartl H, Berhane Y, Czup M. Animal models of henipavirus infection: a review. *The Veterinary Journal* 2009; 181: 211-220

White GB. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1974; 68: 278-298

Williams RA, Vázquez A, Asante I, Bonney K, Odoom S, Pupilampu N, et al. Yaoundé-like virus in resident wild bird, Ghana. *African Journal of Microbiology Research* 2012; 6: 1966-1969

Woods CW, Karpati AM, Grein T, McCarthy N, Gaturuku P, Muchiri E, Bonmarin I. An outbreak of Rift Valley fever in northeastern Kenya, 1997-98. *Emerging infectious diseases* 2002; 8: 138

World Health Organization, Special Programme for Research, Training in Tropical Diseases, World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization. Epidemic, & Pandemic Alert. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. World Health Organization. 2009

World Health Organization. Dengue in Africa: emergence of DENV-3, Côte d'Ivoire, 2008. *Weekly Epidemiological Record* 2009; 84: 85-88

Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Rongsriyam Y. Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4. 0). *Archives of virology* 2009; 1: 153.

Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B, Rota P, bin Adzhar A, White J, Daniels P, Jamaluddin A, Ksiazek T. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerging infectious diseases* 2001; 7: 439-441

Zhang X, Guo X, Fan H, Zhao Q, Zuo S, Sun Q, Mi Z. Complete genome sequence of Menghai flavivirus, a novel insect-specific flavivirus from China. *Archives of virology* 2017; 5: 1435-1439.

Zirkel F, Kurth A, Quan P-L, Briese T, Ellerbrok H, Pauli G, et al. An insect nidovirus emerging from a primary tropical rainforest. *MBio* 2011; 2: e00077-11

Zirkel F, Roth H, Kurth A, Drosten C, Ziebuhr J, Junglen S. Identification and characterization of genetically divergent members of the newly established family mesoniviridae. *Journal of Virology* 2013; 87: 6346-6358

Zwiebel L, Takken W. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. *Insect biochemistry and molecular biology* 2004; 34: 645-652

## 9. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir beim Erstellen der Arbeit geholfen und mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Junglen für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, Ihre hervorragende fachliche Betreuung und stetige Hilfsbereitschaft. Ein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Drost, Leiter der Virologie der Uniklinik Bonn, für die Vergabe des interessanten Themas.

Ein besonderer Dank geht an meine ehemaligen Kollegen und Freunde Anne Kopp, Marco Marklewitz und Florian Zirkel für die großartige Hilfe und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit und der einmaligen Arbeitsatmosphäre im Labor. Ich danke euch für eure Hilfsbereitschaft, eure guten Ideen und Einfälle, eure unbändige Geduld und eure anhaltende Freundschaft.

Ich danke den Kollegen und Mitarbeitern des Kumasi Centre for Collaborative Research auf dem Universitätsgelände in Kumasi für Ihre unterstützende Hilfe und ihren freundlichen Umgang.

Meiner Familie und meinem Mann danke ich für die aufmunternden Worte, die Unterstützung und das Verständnis während der gesamten Zeit des Bearbeitens dieser Dissertation.