

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 6 (1984) 53–60

Aus der Virusabteilung des Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg (Kommissarischer Abteilungsleiter: W. Slenczka) und aus der Geomedizinischen Forschungsstelle im Hygiene-Institut der Universität Graz (Leiter der Forschungsstelle: Prof. Dr. W. Sixl)

Seroepidemiologische Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegen Marburg- und Ebola-Virus in Afrika

Werner Slenczka, Marcella Rietschel, Christian Hoffmann und Wolf Sixl

Einleitung

Marburg-Virus und Ebola-Virus sind Erreger von hämorrhagischen Fiebrern mit sehr hoher Pathogenität für den Menschen (SIEGERT et al. 1967, WHO 1976/1, WHO 1976/2). Obwohl Marburg-Virus bereits im Jahre 1967 durch eine Einschleppung nach Marburg, Frankfurt und Belgrad bekannt geworden ist, ist seine Herkunft im Dunkeln geblieben. Es ist zweifelsfrei erwiesen, daß dieses Virus afrikanischer Herkunft ist: Die Affen, durch welche es nach Europa importiert wurde, stammten aus Uganda, und inzwischen sind auch in Afrika Marburg-Virus-Infektionen festgestellt worden, welche geographisch mit Kenia, Südafrika und mit Zimbabwe assoziiert waren (GEAR et al. 1975, CONRAD et al. 1975, SMITH et al. 1982, WHO 1982). Mehr ist über die Herkunft des Marburg-Virus nicht bekanntgeworden. Insbesondere gibt es keinen Hinweis auf sein Erreger-Reservoir. Die Affen der Spezies *Cercopithecus aethiops*, welche ursprünglich als Reservoir angesehen wurden, kommen wegen der hohen Pathogenität des Erregers für Affen wohl nicht in Frage. Befunde über das Vorkommen von Antikörpern gegen Marburg-Virus bei verschiedenen Affenspezies afrikanischen und auch asiatischen Ursprungs (KAFUKO et al. 1970, KALTER et al. 1969) konnten bei Verwendung von spezifisch reagierenden Antigenen nicht bestätigt werden (SLENCZKA et al. 1972). Auch das Ebola-Virus, welches 1976 durch zwei Epidemien mit hohen Menschenverlusten in Zaire und im südlichen Sudan bekannt wurde, scheint in seinem Vorkommen auf Afrika beschränkt zu sein. Aber auch bei diesem Virus ist die Ansteckungsquelle für den Menschen trotz intensiver Nachforschungen bisher nicht entdeckt worden (WHO 1976/1, WHO 1976/2).

Einer der wichtigsten Gründe für unsere Unkenntnis über die Herkunft dieser beiden Krankheitserreger scheint der Mangel an geeigneten Verfahren für seroepidemiologische Untersuchungen zu sein. Eine solche Technik sollte persistierende Antikörper erkennen lassen. Sie sollte möglichst rasch an einer möglichst großen Anzahl von Probanden durchführbar sein, dies spricht gegen den Einsatz der indirekten Immunfluoreszenz, welche zusätzlich noch durch den Nachteil behaftet ist, daß die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Labor zu Labor zu wünschen übrig läßt.

Ein idealer Test für seroepidemiologische Untersuchungen müßte sich ohne allzu große logistische Probleme von angelerntem Personal in Afrika unter Verwendung von Blut aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen in großen Serien durchführen lassen, so daß Antikörper-Träger möglichst an Ort und Stelle erkannt werden können. Ein solches Verfahren würde die Eingrenzung von Naturherden erlauben. Da die Wahrscheinlichkeit dafür spricht, daß die menschlichen Infektionen in Afrika durch irgendeine einheimische Tierspezies übertragen werden, müßte zusätzlich die Möglichkeit

bestehen, eine große Anzahl von Tierseren verschiedener Spezies auf das Vorkommen von Antikörpern zu untersuchen, ohne dabei für jede Spezies zunächst einmal ein Spezies-spezifisches Antikörper-Konjugat herstellen zu müssen. Wir haben uns bemüht, einen Enzymimmunoassay zu entwickeln, der diesen Anforderungen wenigstens zum Teil gerecht wird: Er kann durch eine kleine Modifikation als Spezies-unabhängiger Test durchgeführt werden und wir meinen, daß er auch in einem mit Kühlgerät, Zentrifuge, entionisiertem Wasser und Strom versehenen Labor durchgeführt werden könnte. Dabei müßten natürlich die Antigene durch ein Sicherheitslabor der Stufe III bzw. IV hergestellt und geliefert werden.

Material und Methoden

Der verwendete Marburg-Virus-Stamm wurde von uns im Jahre 1967 isoliert und ist seither achtmal in Verozellen passagiert worden (SLENCZKA 1969). Der Ebola-Virus-Stamm wurde uns im Jahre 1976 von S. R. PATTYN als Verozellpassage überlassen, er wurde in Zaire isoliert (PATTYN et al. 1977). Beide Viren wurden zur Antigen-Herstellung in Verozellen unter Standardbedingungen vermehrt. Die Verozellen wurden in MEM Eagle in Gegenwart von Hitze-inaktiviertem Kalbserum gezüchtet.

Zur Antigen-Herstellung wurden die Zellen 12 Stunden nach dem Ansetzen mit Virusverdünnungen von 10^{-2} (Ebola-Virus) bzw. 10^{-3} (Marburg-Virus) infiziert. Der Zellrasen war zu diesem Zeitpunkt noch nicht konfluent. Die Infektionsdosis entsprach einer Multiplizität von $10^{-2}ID_{50}/Zelle$. Danach wurden die Zellen für ca. 100 Stunden bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Nach dieser Zeit sind – nachgewiesen durch Immunfluoreszenz – ca. 90% der Zellen infiziert und es ist ein beginnender zytopatischer Effekt sichtbar. Die Virusinaktivierung wird durch Zugabe von Beta-Propiolakton 1:2000 erreicht. Die Substanz wird direkt in die Kulturen hinein pipettiert, und diese werden anschließend über Nacht bei $4^{\circ}C$ inkubiert. Eine Kontrolle des pH-Wertes findet nicht statt. Am nächsten Morgen wird zur Hydrolyse des Beta-Propiolaktons eine 30minütige Inkubation bei $37^{\circ}C$ durchgeführt. Anschließend werden die Zelltrümmer durch Schütteln vom Glas gelöst. Zellkulturmedium und Zellen werden in Zentrifugenbecher umgefüllt und zur Konzentrierung mit 6 Gewichtsprozent Polyethylenglykol 6000 und mit 1% NaCl versetzt. PEG und NaCl werden in Substanz zugesetzt. Nachdem beide gelöst sind, bleiben die Zentrifugenbecher über Nacht im Eisbad stehen und werden am nächsten Morgen 60 Minuten lang bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment dieser Zentrifugation wird in 1/50 des Ausgangsvolumens aufgenommen, bei $3000 \times g$ klar zentrifugiert und dient in dieser Form als Antigen für die Beschichtung von Mikrotiterplatten.

Der Erfolg der Virusinaktivierung wurde durch Kontrollversuche überprüft. Vorversuche hatten gezeigt, daß sogar 1/10 der eingesetzten Beta-Propiolakton-Konzentration ausreichend war, um eine komplette Inaktivierung in weniger als 60 Minuten zu erreichen (SLENCZKA 1980).

Die Beschichtung der verwendeten Polystyrol-Mikrotiterplatten für den Enzymimmunoassay erfolgte bei pH 9,5. Vorversuche zur Festlegung der optimalen Antigen-Konzentration für die Beschichtung ergaben ein ausgeprägtes Zonenphänomen. Die optimale Antigenkonzentration lag für Marburg- und Ebola-Virus bei einer Antigen-Verdünnung von 1:64. Die Platten wurden reihenweise abwechselnd mit Marburg-Virus-Antigen und mit einem in gleicher Weise hergestellten Kontroll-Antigen beschichtet. Jedes Serum wurde bei einer Verdünnung von 1:100 gegen jedes der 3 Antigene getestet. Wir verwendeten ein kommerzielles Anti-Human-IgG-Konjugat mit alkalischer Phosphatase.

Für unsere Untersuchungen standen uns insgesamt 556 Serumproben aus Mobai, Sierra Leone, 284 Serumproben aus dem Sudan sowie 268 Serumproben ohne nähere Herkunftsbezeichnung zur Verfügung. Als Kontrollseren dienten Seren von Personen mit bekannter Infektions-Anamnese für Marburg-Virus oder Ebola-Virus.

Ergebnisse und Diskussion

Empfindlichkeit und Spezifität unseres Enzymimmunoassay wurden durch die Untersuchung von 107 Serumproben von Personen, die eine Marburg-Virus-Infektion durchgemacht hatten, überprüft. Die Reaktion dieser Seren lag durchwegs bei einer optischen Dichte zwischen 500 und 1900 Einheiten mit steigender Tendenz von der 1. bis zur 10. Woche nach Krankheitsbeginn. Serumproben, die 13 Jahre nach der durchgemachten Marburg-Virus-Infektion entnommen worden waren, ergaben immer noch eine optische Dichte von ca. 1000. Als Kontrollseren verwendeten wir 80 Serumproben aus unserer Routine-Diagnostik und 40 Serumproben von Personen, die im Jahre 1967 Kontakt mit Marburg-Virus gehabt hatten, ohne selber zu erkranken. Die Reaktion dieser Serumproben mit dem Marburg-Virus-Antigen und dem Ebola-Virus-Antigen lag unter einer optischen Dichte von 150. Interessanterweise fanden wir, daß die insgesamt 107 Serumproben von Personen, die eine Marburg-Virus-Infektion durchgemacht hatten, auch signifikante Reaktionen mit Ebola-Virus-Antigen aufwiesen, obwohl diese Personen mit diesem Antigen keinen Kontakt gehabt hatten, und obwohl sich eine Kreuzreaktivität zwischen diesen beiden Virus-Antigenen bei Verwendung von experimentellen Immunseren nicht nachweisen läßt (WHO 1976/3).

Diese Kreuzreaktion der Marburg-Virus-Seren mit dem Ebola-Antigen lag bei einer optischen Dichte zwischen 200 und 800, sie zeigte ebenso wie die Marburg-Virus-spezifische Reaktion einen Anstieg bis zur 4. Woche nach Krankheitsbeginn und fiel anschließend ab. Bei den Serumproben, welche 13 Jahre nach einer überstandenen Marburg-Virus-Infektion gewonnen worden waren, lag die Reaktion mit dem Ebola-Antigen immer noch bei einer optischen Dichte zwischen 200 und 500 Einheiten.

Als weiteren Test für die Überprüfung der Spezifität unseres Enzymimmunoassay führten wir eine Vorbehandlung der Antigen-beschichteten Platten mit experimentellen Immunseren durch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben: Die Vorbehandlung mit normalen Meerschweinchen-Seren oder mit einem Antiserum gegen nicht-infizierte Verozellen führte beim Test mit unserem Anti-Marburg-Virus-Standardserum zu einem Reaktionsrückgang von höchstens 11,4%. Dagegen führte die Vorbehandlung mit experimentellen Anti-Marburg-Virus-Immunseren regelmäßig zu Reaktionsrückgängen von mehr als 50%. Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß es ohne weiteres möglich ist, dem Enzymimmunoassay als kompetitiven Test oder Blocking-Test durchzuführen, um Antikörper in tierischen Seren nachzuweisen, ohne für jede zu untersuchende Spezies ein eigenes Anti-IgG-Enzym-Konjugat herstellen zu müssen. Dieser Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern in tierischen Seren ist zweifellos noch verbesserungsfähig. Vor allem wäre es wichtig, ihn als direkten Test unter Verwendung von Anti-Marburg-Virus- und Anti-Ebola-Virus-Enzymkonjugaten durchzuführen.

Als dritte Kontrolle für die Spezifität unseres Enzymimmunoassay haben wir Serumabsorptionen mit dem Kontrollantigen sowie mit dem homologen und dem heterologen Virusantigen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 wiedergegeben. In jedem der Diagramme zeigt die erste Säulengruppe die Reaktion der Serumprobe mit Kontrollantigen, Marburg-Virus-Antigen und Ebola-Virus-Antigen nach Absorption mit dem Wirts-Antigen. Die zweite Säulengruppe zeigt die Reaktion nach Absorption mit

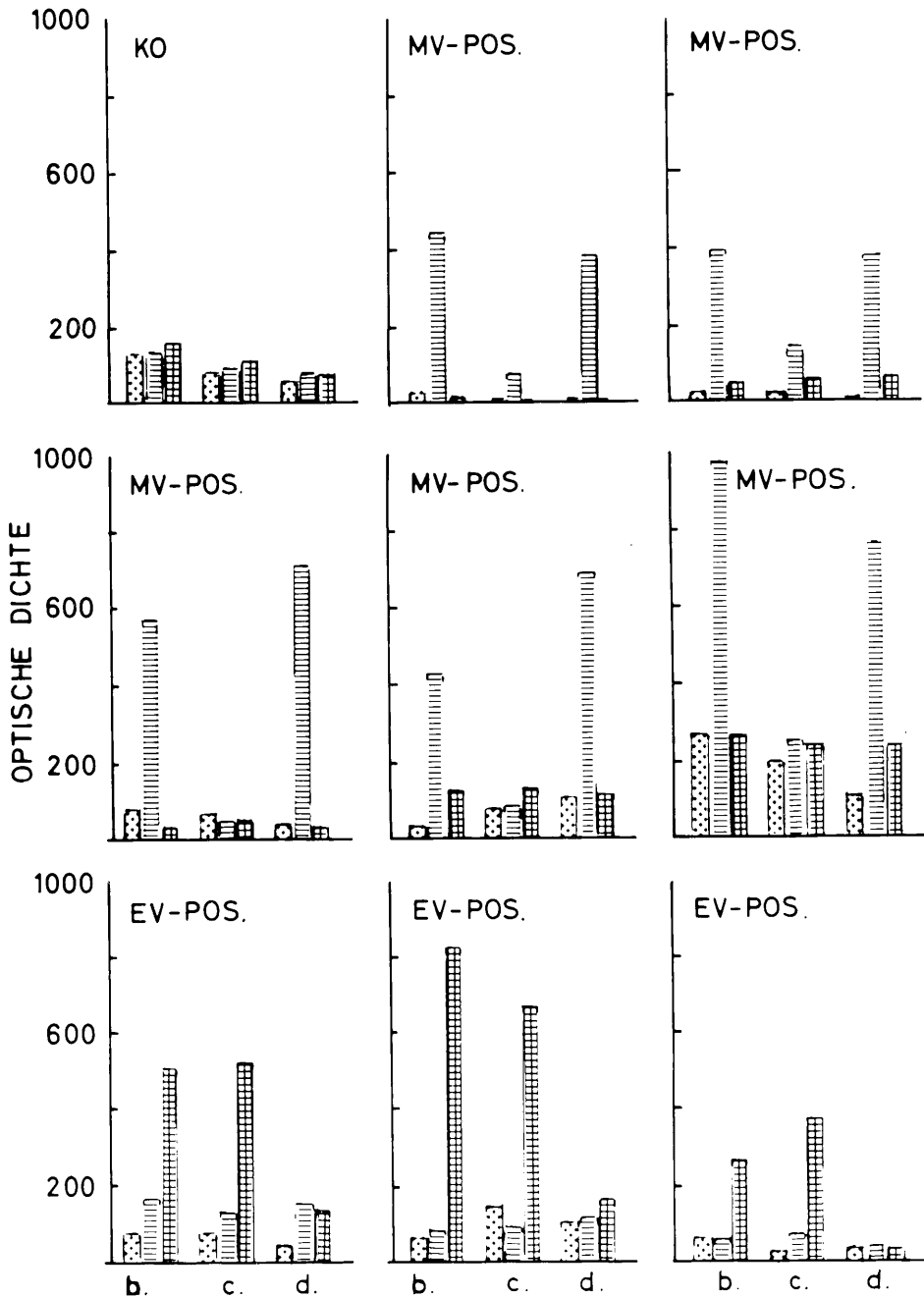


Abb. 1. Untersuchungen von 9 Serumproben mit bekannter Infektionsanamnese auf Antikörper gegen Marburg-Virus und Ebola-Virus

Säulengruppe b: Test nach Absorption mit Wirts-Antigen (Verozellen). Säulengruppe c: Test nach Absorption mit Marburg-Virus-Antigen. Säulengruppe d: Test nach Absorption mit Ebola-Virus-Antigen. Punktierte Säule: Reaktion mit Wirts-Antigen. Schraffierte Säule: Reaktion mit Marburg-Virus-Antigen. Karierte Säule: Reaktion mit Ebola-Virus-Antigen.

TABELLE 1: Durchführung des Enzymimmunoassay als Blocking-Test. Reaktionsrückgang nach Vorbehandlung der Antigen-beschichteten Platten mit tierischen Immunsereen

Vorbehandlung	Extinktion E	Reaktionsrückgang in %
ohne Vorbehandlung	440 E	
Vorbehandlung mit Anti-Vero-Meerschweinchenserum	432 E	1,8%
Vorbehandlung mit normalem Meerschweinchenserum	390 E	11,4%
Vorbehandlung mit normalem Meerschweinchenserum	407 E	7,5%
Vorbehandlung mit Anti-MV-Meerschweinchenserum	152 E	65,5%
Vorbehandlung mit Anti-MV-Hamsterserum	195 E	44,3%

Marburg-Virus-Antigen, die dritte Säulengruppe die Reaktion nach Absorption mit Ebola-Virus-Antigen. Es zeigt sich, daß die Reaktion von Marburg-Virus-Antiseren mit dem homologen Antigen nur durch eine vorherige Absorption mit diesem Antigen, nicht aber durch die Absorption mit Ebola-Virus-Antigen oder Kontrollantigen auf 10% reduziert werden kann. In gleicher Weise kann die Reaktion von Ebola-Virus-Immunsereen mit dem entsprechenden Antigen nur durch eine Absorption mit diesem Antigen und nicht mit Marburg-Virus-Antigen oder Kontrollantigen beseitigt werden.

Da sich in den Serumkollektiven aus Afrika ein hoher Prozentsatz von Serumproben befand, welche starke Reaktionen mit allen 3 Antigenen aufwiesen, hat es sich als notwendig erwiesen, die Absorption mit Wirts-Antigen sowie mit dem Marburg-Virus- und dem Ebola-Virus-Antigen bei allen diesen Serumproben durchzuführen. Abb. 2 zeigt die Ergebnisse von 12 afrikanischen Serumproben, bei denen wir der Ansicht sind, daß sie Antikörper gegen Ebola-Virus enthalten. In der ersten Zeile sind die Ergebnisse wiedergegeben, die wir nach Testung dieser Seren ohne Vorbehandlung erhalten haben, in der zweiten Zeile finden sich die Reaktionen nach Absorption mit Wirts-Antigenen, in der dritten Zeile nach Absorption mit Marburg-Virus-Antigen und in der vierten Zeile nach Absorption mit Ebola-Virus-Antigen. Es zeigt sich, daß diese 12 Serumproben bereits ohne Vorbehandlung besonders stark mit dem Ebola-Virus-Antigen reagierten und daß diese Reaktion weder durch die Vorbehandlung mit Kontroll-Antigen noch durch die Vorbehandlung mit Marburg-Virus-Antigen, sondern erst durch die Vorbehandlung mit Ebola-Virus-Antigen signifikant reduziert wird.

Unsere Kriterien für einen positiven Antikörper-Nachweis in einer unbekannten Serumprobe sind, daß die Reaktion mit dem homologen Antigen nach Absorption mit den heterologen Antigenen im 2-Sigma-Bereich der Mittelwerte unserer Standardseren liegen muß. Die Reaktion mit dem heterologen Antigen muß im 1-Sigma-Bereich der Mittelwerte aller negativen Kontrollseren liegen. Nach Absorption der Serumprobe mit dem homologen Virus-Antigen muß die Reaktion mit diesem Antigen im 1-Sigma-Bereich der Mittelwerte aller Kontrollseren liegen, das heißt, daß sie mindestens um 60% reduziert werden muß.

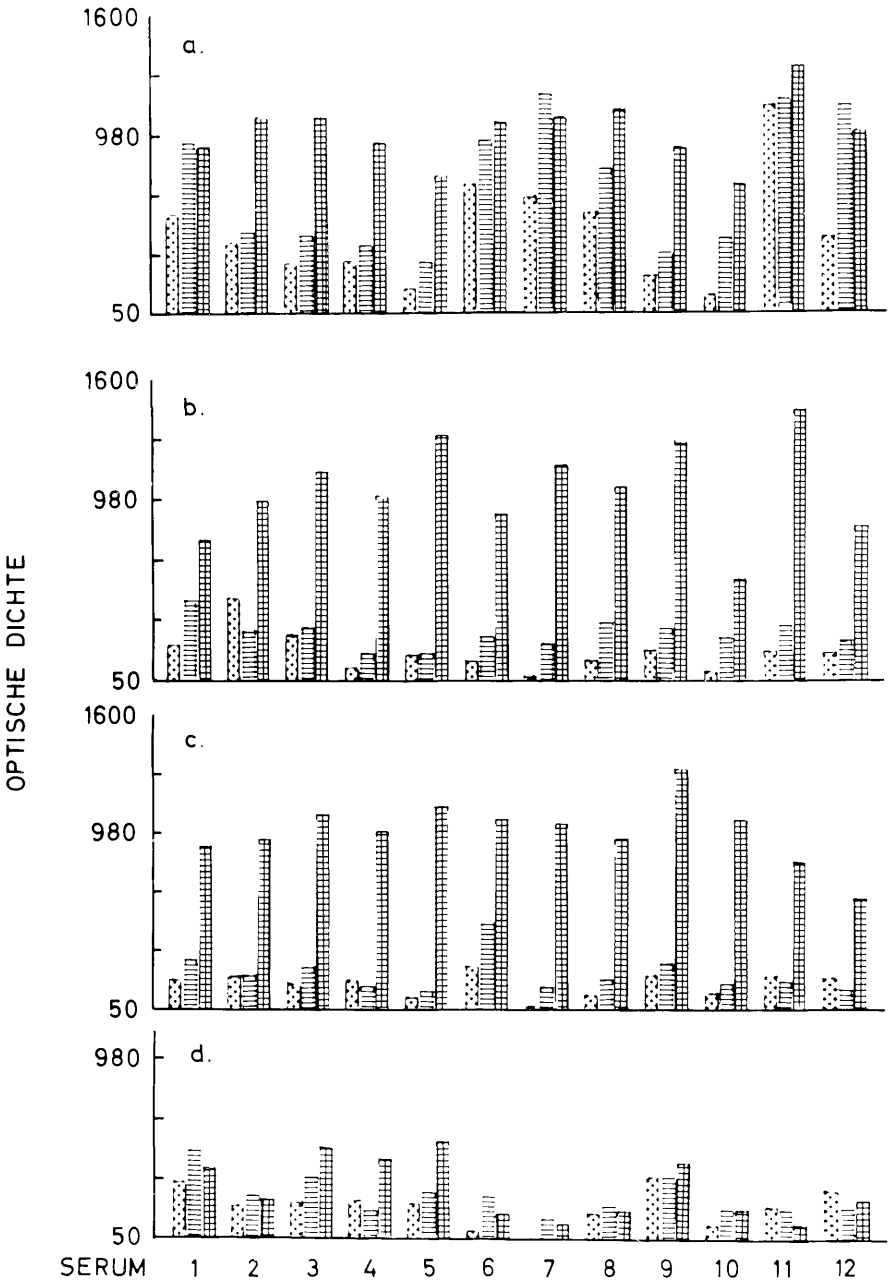


Abb. 2. Untersuchungen von 12 Serumproben mit unbekannter Infektionsanamnese auf Antikörper gegen Marburg-Virus und Ebola-Virus. Nach unseren Kriterien enthalten diese Seren Antikörper gegen Ebola-Virus

Säulengruppe a: Test ohne vorausgehende Absorption. Säulengruppe b: Test nach Absorption mit Wirts-Antigen. Säulengruppe c: Test nach Absorption mit Marburg-Virus-Antigen. Säulengruppe d: Test nach Absorption mit Ebola-Virus-Antigen. Punktierter Säule: Reaktion mit Wirts-Antigen. Schraffierter Säule: Reaktion mit Marburg-Virus-Antigen. Karierte Säule: Reaktion mit Ebola-Virus-Antigen.

TABELLE 2: Antikörper gegen Ebola-Virus bei Afrikanern

Herkunft der Seren	An- zahl	EIA positiv, IF positiv	%	EIA positiv, IF negativ oder fraglich	%	EIA negativ, IF positiv	%
Mobai Sierra Leone	556	10	1,8	10	1,8	0	
Sudan	284	1	0,35	0		1	0,35
unbestimmt	268	0		0		2	0,76

Tab. 2 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse unserer bisher durchgeführten seroepidemiologischen Untersuchungen in Sierra Leone und im Sudan. Wir haben bei 20 von 556 Serumproben aus Sierra Leone Antikörper gegen Ebola-Virus nachweisen können, dies entspricht einer Häufigkeit von 3,6%. Parallel durchgeführte Untersuchungen mit der indirekten Immunfluoreszenz ergaben nur in der Hälfte dieser Serumproben einen positiven Befund. Unter den Serumproben aus dem Sudan fanden wir nur in einem Fall Antikörper gegen Ebola-Virus mit beiden Methoden. Antikörper gegen Marburg-Virus haben wir in keiner dieser insgesamt 1108 afrikanischen Serumproben nachweisen können. Wir sehen in diesem Ergebnis einen zusätzlichen Beweis für die Richtigkeit unserer Funde von Ebola-Virus-Antikörpern in diesem Serumkollektiv.

Die vorgetragenen Untersuchungsergebnisse sind nur ein Anfang, aber sie lassen deutlich erkennen, daß in Sierra Leone mit dem Vorkommen von Ebola-Virus gerechnet werden muß und daß die menschliche Infektion mit diesem Virus dort kein seltenes Ereignis ist. Es ist anzunehmen, daß das Auftreten dieser Infektionen nicht epidemisch, sondern eher sporadisch erfolgt und daß der Krankheitsverlauf der Ebola-Virus-Infektion bei „natürlicher“ Infektion wesentlich weniger dramatisch ist, als nach Inokulation von infektiösem Blut. Die Häufigkeit, mit der Hinweise auf durchgemachte Ebola-Virus-Infektionen bei der Bevölkerung zu erhalten sind, unterstreicht die Notwendigkeit, die Quelle der menschlichen Infektionen möglichst bald zu identifizieren.

Zusammenfassung

Ebola-Virus und Marburg-Virus sind für den Menschen hochpathogene Erreger hämorrhagischer Fieber. Beide Viren sind afrikanischen Ursprungs, die geographische Verbreitung und die Epizootologie ist noch nicht bekannt. Wir untersuchten mit einem neu entwickelten Enzymimmunotest menschliche Serumproben aus dem Sudan und aus Sierra Leone auf Antikörper gegen diese beiden Viren. Zur Bestätigung der serologischen Spezifität wurden jeweils Absorptionen mit dem homologen und dem heterologen Virus-Antigen durchgeführt. Wir fanden Antikörper gegen Ebola-Virus in 20 Serumproben (= 3,6%) aus Sierra Leone und in einer Probe (= 0,35%) aus dem Sudan. Hinweise auf Marburg-Virus-Infektionen haben wir nicht erhalten.

Summary

Antibody against Marburg virus and Ebola virus in Africa. Results of seroepidemiological investigations

Ebola virus and Marburg virus are etiologic agents of hemorrhagic fever with high pathogenicity for humans. Both viruses are of African origin, their geographic distribution and epizootology have not yet been determined. We have investigated human

sera from Sierra Leone and from Sudan for antibodies against these viruses with a recently developed enzymeimmunoassay. Absorptions with the homologous and heterologous virus antigens were carried out for confirmation of the serologic specificity. We detected antibodies against Ebola virus in 20 specimens (= 3,6%) from Sierra Leone and in one Specimen (= 0,35%) from Sudan. Evidence of Marburg virus infection was not obtained in this investigation.

Literatur

- CONRAD, J. L., M. ISAACSON, E. B. SMITH et al. (1978): Epidemiologic investigation of Marburg virus disease, Southern Africa 1975. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 1210–1215.
- GEAR, J. S. S., G. A. CASSEL, A. J. GEAR et al. (1975): Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br. Med. J.* 4, 489–493.
- KAFUKO, G. W., B. E. HENDERSON, M. C. WILLIAMS, R. E. KISSLING (1970): Investigations in Uganda relating to the Marburg agent. In: H. BALNER, W. I. B. BEVERIDGE (eds.): *Infections and Immunosuppression in Subhuman Primates*. Munksgaard, Kopenhagen 1970.
- KALTER, S. S., J. L. RATNER, R. L. HEBERLING (1969): Antibodies in Primates to the Marburg virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 130, 10–12.
- PATTYN, S. R., W. JACOB, G. VAN DER GROEN et al. (1977): Isolation of Marburg virus like virus from a case of haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* i, 573–574.
- SIEGERT, R., H. L. SHU, W. SLENCZKA, D. PETERS, G. MÜLLER (1967): Zur Ätiologie einer unbekannten, von Affen ausgegangenen Infektionskrankheit. *Dtsch. Med. Wschr.* 92, 2341–2343.
- SLENCZKA, W., G. WOLFF, R. SIEGERT (1972): A critical study of monkey sera for the presence of antibody against the Marburg virus. *Amer. J. Epidem.* 93, 496–505.
- SLENCZKA, W. (1969): Growth of Marburg virus in Vero cells. *Lab. Anim. H.*, 143–147.
- SLENCZKA, W. (1980): unveröffentlicht.
- SMITH, D. H., M. ISAACSON, K. M. JOHNSON et al. (1982): Marburg virus disease in Kenya. *Lancet* i: 816–820.
- World Health Organization (1976a): Ebola haemorrhagic fever in Sudan. Report of a WHO International Study Team. *Bull. WHO* 56, 247–270.
- World Health Organisation (1976b): Ebola haemorrhagic fever in Zaire. Report of an International Commission. *Bull. WHO* 56, 271–293.
- World Health Organization (1976c): WHO Weekly Epidemiological Record 46: 354.

KORRESPONDENZADRESSE:

Prof. Dr. W. Slenczka
Zentrum für Hygiene der Universität Marburg, Virusabteilung
Pilgrimstein 2
D-3550 Marburg/Lahn

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1984

Band/Volume: [6](#)

Autor(en)/Author(s): Slenczka Werner, Rietschel Marcella, Hoffmann Christian, Sixl Wolf

Artikel/Article: [Seroepidemiologische Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegen Marburg- und Ebola-Virus in Afrika. 53-60](#)