

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Funktionsprüfung einer m-RT-PCR-ELISA zur
Detektion arboviraler und parasitärer Infektionen,
insbesondere Dengue-Virus und Malaria, anhand
von Patientenproben aus ländlichen Regionen
Kolumbiens

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Gregor Haist
aus Mannheim

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

14. Juli 2023

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis.....	6
II.	Tabellenverzeichnis.....	7
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	8
1	Einleitung.....	10
2	Literaturdiskussion.....	11
2.1	Akutes fiebriges Syndrom	11
2.2	Malaria	12
2.3	Arboviren.....	14
2.3.1	Dengue	15
2.3.1.1	Erreger und Übertragung.....	15
2.3.1.2	Verbreitung und Krankheitslast	15
2.3.1.3	Krankheitsbild.....	16
2.3.1.4	Hämorrhagisches Dengue-Fieber und Dengue-Schocksyndrom ...	17
2.3.1.5	Diagnostik.....	18
2.3.1.6	Therapie	21
2.3.1.7	Prävention	22
2.3.1.8	Dengue in Tansania	23
2.3.1.9	Dengue in Kolumbien	23
2.3.2	Andere Flaviviren.....	24
2.3.2.1	Gelbfieber-Virus	24
2.3.2.2	Zika-Virus	25
2.3.2.3	West-Nile-Virus	25
2.3.3	Togaviren.....	26
2.3.3.1	Chikungunya-Virus.....	26
2.3.3.2	O'nyong-nyong-Virus.....	26
2.3.3.3	Semliki-Forest-Virus	27
2.3.4	Rift-Valley-Fever-Virus.....	27
2.4	Studienort Kolumbien	28
2.4.1	Quibdó	29
2.4.2	Apartadó	29
2.4.3	Turbo	29
2.5	Forschungsfragen	31

2.6	Hypothesen	31
3	Material & Methoden	32
3.1	Material	32
3.2	Methoden	37
3.2.1	Studienorte.....	37
3.2.1.1	Studienort 1: Quibdó, <i>Hospital Ismael Roldán Valencia</i>	37
3.2.1.2	Studienort 2: Apartadó, <i>Clínica Antonio Roldán Betancur</i>	38
3.2.1.3	Studienort 3: Turbo, <i>Hospital Francisco Valderrama</i>	38
3.2.2	Studienpopulation	39
3.2.2.1	Inklusionskriterien.....	39
3.2.2.2	Exklusionskriterien	39
3.2.2.3	Ethische Gesichtspunkte.....	39
3.2.3	Anamnese und klinische Untersuchung der Patienten.....	40
3.2.4	Probenentnahme, Aufbewahrung und Transport	41
3.2.4.1	Venöses Blut	41
3.2.4.2	Getrocknetes Blut auf Filterkarten	41
3.2.5	Diagnostik vor Ort	42
3.2.6	Nukleinsäure-Extraktion der Plasmaproben in Kolumbien	42
3.2.7	Analyse mit der Multiplex-RT-PCR-ELISA-Methode	43
3.2.7.1	Positivkontrollen und Primer	44
3.2.7.2	Reverse Transkription der eluierten Proben	47
3.2.7.3	Multiplex-PCR	48
3.2.7.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	48
3.2.7.5	PCR-ELISA	49
3.2.8	Einzelprimer-RT-PCR-ELISA Dengue Serotypen	52
3.2.9	EP-RT-PCR-ELISA Malaria Spezies.....	53
3.2.10	Filterkarten: Dengue-positive Proben	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Das Patientenkollektiv	55
4.1.1	Soziodemographische Daten.....	55
4.1.2	Vitalparameter.....	57
4.1.3	Krankengeschichte der Probanden.....	57
4.1.3.1	Voroperationen.....	57
4.1.3.2	Infektionserkrankungen	58
4.1.3.2.1	Malaria	58

4.1.3.2.2	Dengue	58
4.1.3.2.3	Zika	58
4.1.3.3	Weitere Vorerkrankungen.....	58
4.1.4	Häufigste Symptome zum Untersuchungszeitpunkt.....	59
4.1.5	Detektierte Infektionen	60
4.1.5.1	Schnelltests	60
4.1.5.2	RT-PCR-ELISA	60
4.1.5.2.1	Malaria in der m-RT-PCR-ELISA	60
4.1.5.2.2	Dengue in der m-RT-PCR-ELISA.....	61
4.1.5.3	EP-RT-PCR-ELISA Dengue Serotypen.....	62
4.1.5.4	m-RT-PCR-ELISA ausgehend von Filterkarten	62
4.1.6	Vergleich positiv und negativ getesteter Patienten	63
4.1.6.1	Symptome	63
4.1.6.2	Durchschnittlicher Hämoglobinwert	65
4.1.6.3	Altersdurchschnitt.....	65
4.1.7	Patienten mit Dengue-Warnsignalen	67
5	Diskussion	68
6	Zusammenfassung	74
7	Literaturverzeichnis	75
8	Anhang.....	86

I. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Annäherung der weltweiten Verbreitung von Malaria

Abb.2: Das Infektionsrisiko von Dengue weltweit

Abb.3: Krankheitsverlauf Dengue-Fieber

Abb.4: Auftreten verschiedener Biomarker in Patienten mit DENV-Infektion

Abb.5: Mortalität durch Dengue in kolumbianischen Gemeinden (1985-2012)

Abb.6: Karte von Kolumbien

Abb.7: Lage Quibdó, Chocó, Kolumbien

Abb.8: Lage der Region Urabá in Kolumbien

Abb.9: Schema Funktionsweise PCR-ELISA

Abb.10: Eluierung des Vollblutes aus den Filterkarten

Abb.11: Berufsgruppen der Probanden

Abb.12: Häufigste Symptome

Abb.13: Probe Nummer 91 im Gel

Abb.14: Häufigste Symptome aufgeschlüsselt nach Infektionen

Abb.15: Durchschnittliche Hämoglobinwerte aufgeschlüsselt nach Infektionen

Abb.16: Mittleres Alter der Patienten aufgeschlüsselt nach Infektionen

Abb.17: Verteilung aufgetretener Warnsignale unter DENV-positiven Patienten

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendetes Material, Allgemeines

Tabelle 2: Verwendetes Material und Reagenzien für die Nukleinsäureisolation der Proben

Tabelle 3: Material zur Probengewinnung und Probenaufbewahrung in Kolumbien

Tabelle 4: Verwendetes Material für die Eluierung der Filterkarten

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien für die Reverse Transkription

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien für die Singleplex- und Multiplex-PCR

Tabelle 7: Verwendetes Material und Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 8: Verwendetes Material und Reagenzien für die ELISA-Hybridisierung

Tabelle 9: Angesetzte Lösungen und Puffer

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Tabelle 11: Verwendete Positivkontrollen

Tabelle 12: Verwendete Primer und Sonden

Tabelle 13: Mastermix und Protokoll für die RT

Tabelle 14: Mastermix und Protokoll für die m-PCR

Tabelle 15: Mastermixe und Protokolle der Einzelprimer-RT-PCR

Tabelle 16: Das Patientenkollektiv

Tabelle 17: Vitalparameter

Tabelle 18: Weitere Vorerkrankungen

Tabelle 19: Detektierte Erkrankungen

Tabelle 20: Detektierte Serotypen

III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AFE	Akut fiebrige Erkrankung
AFI	Acute febrile illness
AG	Arbeitsgruppe
Arbo	Arthropod-borne
ca.	Circa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CES	Corporación para estudios en la salud
CHIKV	Chikungunya-Virus/Viren
DENV	Dengue-Virus/Viren
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHF	Hämorrhagisches Dengue-Fieber
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dengue-Schocksyndrom
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP	Einzelprimer
Fc	Fragment crystallizable
h	Stunden
H ₂ O	Nukleasefreies Wasser, steril und autoklaviert, DEPC-behandelt
Ig	Immunglobulin
km	Kilometer
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
m	Multiplex
MAL	Malaria
min.	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl der Befragten
NMFI	Non-malarial febrile illness
NS1	Non-structural protein 1
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Ø	Mittelwert
ONNV	O'nyong-nyong-Virus
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
Poly(A)	Polyadenylic acid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse Transkription

RVFV	Rift-Valley-Fever-Virus
SFV	Semliki-Forest-Virus
S _p O ₂	Periphere kapilläre Sauerstoffsättigung
<i>Spp.</i>	<i>Species pluralis</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
UdeA	Universidad de Antioquia/Universität von Antioquia
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
WNV	West-Nile-Virus
YFV	Yellow-Fever-Virus/Gelbfieber-Virus
ZIKV	Zika-Virus
μl	Mikroliter

1 Einleitung

Akut fiebrige Erkrankungen (AFE) sind global verbreitet und können durch unterschiedlichste Pathogene ausgelöst werden. Häufige Symptome sind, neben rasch einsetzendem Fieber, besonders Kopfschmerzen sowie Muskel- und Gelenkschmerzen. Oft lässt sich anhand klinischer Untersuchungen keine sichere Diagnose stellen, wodurch eine erregerspezifische Therapie enorm erschwert wird (Chappuis et al., 2013).

Deshalb sind diagnostische Tests zur Differenzierung und Erkennung möglicher Pathogene von großer Bedeutung. Diagnostikmethoden, die auf mehrere Erreger gleichzeitig testen können, haben großes Potenzial besonders in Regionen, in denen verschiedene Erreger von AFE nebeneinander vorkommen. Insbesondere in tropischen und subtropischen Gebieten sind neben Malaria häufig Arboviren Auslöser dieses Syndroms (Braack et al., 2018).

Während einer Kooperation mit Gesundheitseinrichtungen in Tansania wurde von der Arbeitsgruppe Gehring der Universitätsmedizin Mainz eine Multiplex-RT-PCR-ELISA für die gleichzeitige Detektion von Malaria und 8 Arboviren entwickelt. In Proben aus Tansania konnten jedoch keine arboviralen Infektionen festgestellt werden, sodass Fragen bezüglich der Funktionsfähigkeit teilweise ungeklärt blieben.

Ziel dieser Arbeit war die weitere Funktionsprüfung der Multiplex-RT-PCR-ELISA-Nachweismethode durch ihre Anwendung in einer anderen klinischen Umgebung. Dafür wurden in einer Partnerschaft mit der Universität von Antioquia in Kolumbien Patientenproben gesammelt und später in Mainz mit der m-RT-PCR-ELISA getestet.

Das grundsätzliche Bestreben ist, die entwickelte m-RT-PCR-ELISA so zu etablieren und zu validieren, dass sie im klinischen Kontext zur Verbesserung von Diagnostik und somit auch der Behandlung akuter fiebriger Erkrankungen eingesetzt werden kann.

2 Literaturdiskussion

2.1 Akutes fiebriges Syndrom

Die Bedeutung des Terminus „Akutes fiebriges Syndrom“, auf Englisch acute febrile illness (im Folgenden AFI), ist nicht klar definiert und hängt stark vom klinischen Setting ab. Generell beschreibt AFI fiebrige Erkrankungen unterschiedlicher Genese, häufig solche ohne offensichtlichen Ursprung (Rhee et al., 2019). Lange Jahre war Malaria der wichtigste Auslöser akuter fiebriger Syndrome in Lateinamerika. Nicht zuletzt durch effektive Kontrollprogramme ist die Inzidenz in den letzten Jahren in vielen Ländern Lateinamerikas rückläufig (Recht et al., 2017, Carter et al., 2015). Dadurch verändert sich auch die epidemiologische Landschaft. Die sogenannte non-malarial febrile illness (im Folgenden NMFI) und ihre Erreger gewinnen zunehmend an Bedeutung (Moreira et al., 2018, Forshey et al., 2010). Besonders von Arthropoden übertragene Viren, im Englischen arthropod-borne viruses (nachfolgend als Arboviren bezeichnet) sind wichtige Erreger von NMFI (Forshey et al., 2010). Sowohl Malaria als auch Infektionen mit Arboviren können einen schweren Verlauf nehmen, die meisten lassen sich allerdings durch eine adäquate Therapie gut behandeln. Die dafür nötige Identifikation des Erregers ist durch klinische Diagnostik kaum zu bewerkstelligen (Chappuis et al., 2013, Waggoner et al., 2016b). Deshalb ist die Entwicklung und Implementierung diagnostischer Tests unabdingbar für die erfolgreiche Bekämpfung dieser Erreger (Donoso Mantke et al., 2018, Abdad et al., 2017).

Durch gleichzeitiges Testen mehrerer Pathogene mit der neunvalenten m-RT-PCR-ELISA soll die diagnostische Effizienz erhöht und Zeit und Material gespart werden. Das Panel der in dieser Arbeit behandelten m-RT-PCR-ELISA wurde auf folgende 9 Pathogene ausgelegt: Malaria (MAL), Dengue-Virus (DENV), Zika-Virus (ZIKV), Chikungunya-Virus (CHIKV), O'nyong-nyong-Virus (ONNV), Gelbfieber-Virus (YFV), Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV), West-Nile-Virus (WNV) und Semliki-Forest-Virus (SFV).

2.2 Malaria

Malaria ist eine von Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursachte, potenziell tödliche Erkrankung. Die Plasmodien werden durch den Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke übertragen und befallen nach dem Stich zuerst Hepatozyten. Dort vermehren sie sich und gelangen anschließend in den Blutkreislauf, wo sie Erythrozyten befallen. Bislang sind 5 Plasmodien bekannt, die Malaria in Menschen auslösen können: *P.falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi*. Die beiden wichtigsten Vertreter sind *P. vivax* und *P. falciparum*. Letztere ist die dominante Spezies in Afrika und gilt als häufigster Verursacher von schweren Verlaufsformen. Im Rest der Welt ist *P.vivax* die dominante Spezies. Die WHO schätzt, dass es im Jahr 2019 weltweit etwa 229 Millionen Infektionen und etwa 409 000 Todesfälle durch Malaria gab, die meisten davon in Sub-Sahara-Afrika. Kinder unter 5 Jahren sind mit etwa 67% der Todesfälle die weltweit am stärksten betroffene Gruppe (WHO, 2020b, Magill et al., 2013, Meyer, 2019).

Malaria ist eine fieberhafte Erkrankung, die sowohl akut als auch chronisch verlaufen kann. Weiterhin werden schwere und milde Verläufe voneinander abgegrenzt. Häufig manifestiert sich die Krankheit zu Beginn durch unspezifische Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Schüttelfrost, weshalb laut WHO alle Malaria-Verdachtsfälle entweder durch Schnelltest oder Mikroskop-Diagnostik verifiziert werden sollten. Schwere Verlaufsformen können zahlreiche Organsysteme wie Nieren oder Gehirn betreffen. Nicht selten kommt es dabei zu Gerinnungsstörungen und einer schweren Anämie durch starke Hämolyse. Eine rechtzeitige Diagnose und adäquate Therapie sind von großer Bedeutung, denn so kann Malaria in der Regel geheilt werden (CDC, 2020b, Mathison and Pritt, 2017, WHO, 2015). Durch wiederholte Re-Infektionen können manche Menschen eine Teilimmunität entwickeln, die zu milden oder asymptomatischen Verläufen führen kann (Meyer, 2019, WHO, 2020b).

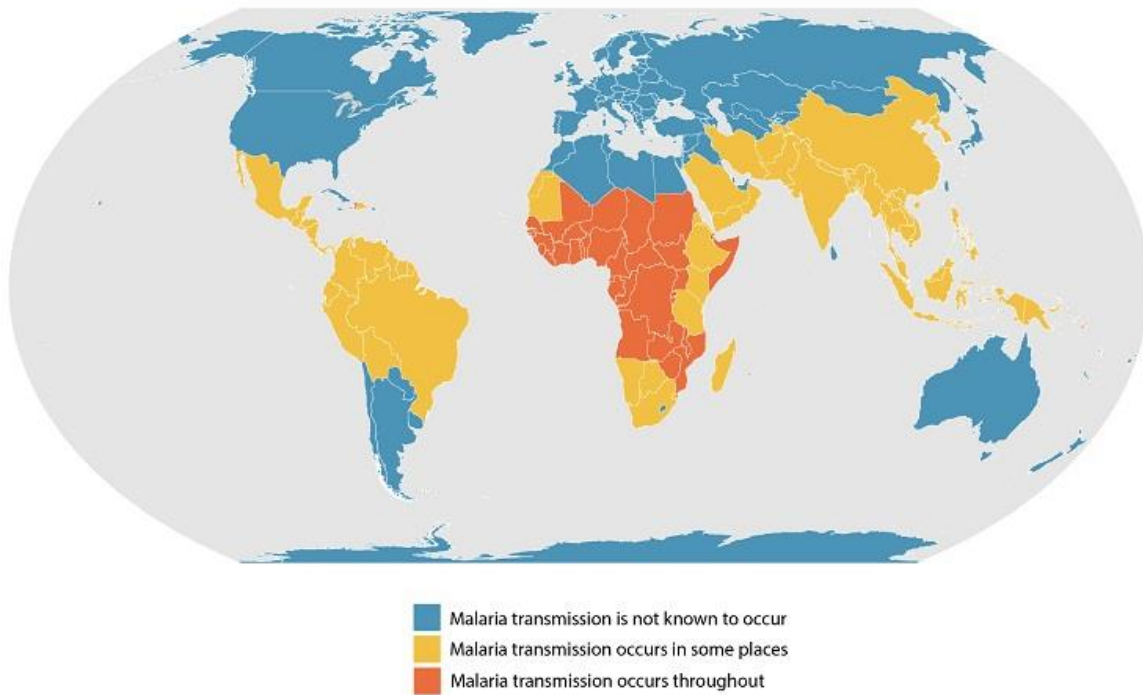


Abb.1: Annäherung der weltweiten Verbreitung von Malaria

Blau: Malaria-Übertragung ist nicht bekannt

Gelb: Malaria-Übertragung kommt an manchen Orten vor

Orange: Malaria-Übertragung kommt überall vor

(CDC, 2020c)

2.3 Arboviren

Arboviren nutzen Arthropoden, wie zum Beispiel Mücken, Sandmücken oder Zecken, als Vektoren zur Übertragung. Wirbeltiere dienen dabei als Reservoir für Arboviren. Wenn sich ein Arthropod an einem infizierten Wirt ernährt, nimmt er die in der Blutbahn zirkulierenden Viren in sich auf. Nach weiterer Vermehrung im Vektor können die Viren dann bei der nächsten Blutmahlzeit über den Speichel des Tieres auf den neuen Wirt übertragen werden. Arbovirale Infektionen können entweder stumm verlaufen oder sich klinisch anhand von Symptomen manifestieren (Meyer, 2019, Girard et al., 2020, Valentine et al., 2019). Es gibt viele verschiedene Arboviren. Die meisten medizinisch relevanten unter ihnen sind jedoch Angehörige weniger Gattungen. Dazu zählen insbesondere *Flavivirus*, *Alphavirus* und *Orthobunyavirus* (Forshey et al., 2010).

2.3.1 Dengue

2.3.1.1 Erreger und Übertragung

Dengue-Viren sind behüllte einsträngige RNA-Viren und gehören zu den Flaviviren. Es gibt vier verschiedene humanpathogene Serotypen (DENV1-DENV4), die eng miteinander verwandt sind (WHO, 2020a).

Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch den Stich einer weiblichen Stechmücke der Gattung *Aedes*, die vor allem im urbanen und peri-urbanen Bereich vorkommen. Der wichtigste Vektor ist *Ae. aegypti*, aber auch *Ae. albopictus*, *Ae. scutellaris* und *Ae. polynesiensis* können DENV übertragen. Man geht davon aus, dass eine durchgemachte Infektion lebenslange Immunität gegen den infizierenden Serotypen hinterlässt (Magill et al., 2013, Meyer, 2019).

2.3.1.2 Verbreitung und Krankheitslast

Die Inzidenz der Erkrankung hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen, wobei die Angaben je nach Quelle variieren. Unter anderem verantwortlich dafür sind sowohl unerkannte als auch falsch diagnostizierte Fälle (Meyer, 2019).

Laut den amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ist Dengue in über 100 Ländern der Welt endemisch und damit aktuell die häufigste arbovirale Erkrankung der Welt. Ungefähr 3 Milliarden Menschen leben weltweit in Gegenden, in denen das Risiko besteht, sich mit Dengue anzustecken. Jährlich infizieren sich ca. 400 Millionen Menschen, von denen rund ein Viertel erkrankt, etwa 22.000 versterben an einem schweren Verlauf (CDC, 2020a, Magill et al., 2013).

Dengue verursacht häufig große Ausbrüche, wie zum Beispiel 2016 in Brasilien. In diesem Jahr meldete das südamerikanische Land 1,5 Millionen Fälle, etwa viermal so viele wie im Jahr 2014 (WHO, 2020a).

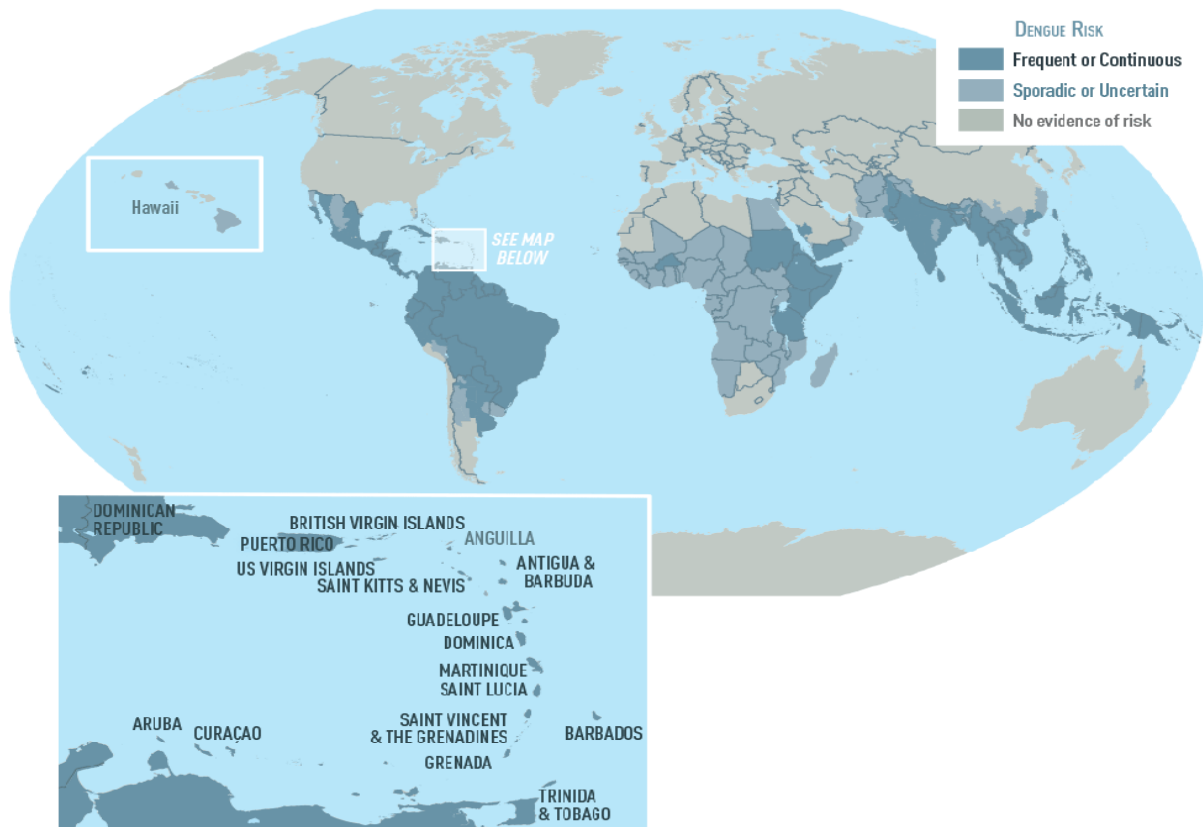


Abb.2: Das Infektionsrisiko von Dengue weltweit

Dunkelblau: Häufige oder dauerhafte Ausbrüche/Übertragungen finden statt

Hellblau: Sporadisch oder ungewiss; Das Risiko variiert, die Datenlage ist nicht eindeutig

Grau: Keine Beweise für ein Übertragungsrisiko (CDC, 2020d)

2.3.1.3 Krankheitsbild

Die Inkubationszeit von Dengue bewegt sich je nach Quelle zwischen 2 und 14 Tagen. Nach der Inkubationszeit kann es zur Entwicklung klinischer Symptome kommen. Das klassische Dengue-Fieber manifestiert sich als grippeähnliche fiebrige Erkrankung. Neben hohem Fieber (40°C) gelten starke Myalgien und Arthralgien, retrobulbäre Schmerzen und ein distal beginnendes Exanthem als charakteristische Erscheinungen. Die Symptome dauern meist 2-7 Tage an (Meyer, 2019, WHO, 2009).

2.3.1.4 Hämorrhagisches Dengue-Fieber und Dengue-Schocksyndrom

3-7 Tage nach Krankheitsbeginn erreichen die Patienten die sogenannte kritische Phase, die mit Abfall des Fiebers auf unter 38°C beginnt und etwa 24-48h andauert. In den meisten Fällen tritt danach die Erholungsphase ein (WHO, 2020a).

Ein geringer Teil der Patienten entwickelt in der kritischen Phase eine schwere Dengue-Infektion, die sich als hämorrhagisches Dengue-Fieber (DHF) oder Dengue-Schock-Syndrom (DSS) manifestieren kann. Als besonders gefährdet gelten Kinder im Alter von 2-7 Jahren und Patienten, die zuvor bereits mit einem anderen Serotyp infiziert waren. Grund für Letzteres ist, dass eine durchgemachte Infektion eine teilweise kreuzreaktive Immunität hinterlässt. Die Antikörper gegen den vorherigen Serotyp binden an die Viren vom neuen Serotyp, führen aber nicht zu einer Neutralisation, sondern erleichtern über Fc-Rezeptoren die Aufnahme der Viren in die Wirtszelle. Dadurch kommt es im Verlauf zu einer verstärkten Virämie. Dieser Prozess wird antibody-dependent enhancement genannt (Meyer, 2019, Alejandria, 2015, Guzman et al., 2013, Halstead, 2003, Izmirly et al., 2020).

DHF ist gekennzeichnet durch Symptome von Dengue-Fieber in Verbindung mit Thrombozytopenie (<100.000 Blutplättchen pro mm^3), Plasmaleckagen (Anstieg des Hämatokrits durch Hämokonzentration, Aszites, Lungenödeme) und unterschiedlich stark ausgeprägte Hämorrhagie (Magill et al., 2013, Alejandria, 2015, Rodrigo et al., 2021). Plasmaleckagen und Hämorrhagie entstehen sowohl durch immunvermittelte Prozesse, als auch durch direkte Effekte der Viren auf die Wirtszellen (Guzman et al., 2013).

Die schwerwiegendste Manifestation des DHF ist das Dengue-Schock-Syndrom, gekennzeichnet durch Organversagen, intravasale Gerinnung und schwere Hämorrhagie. Unbehandelt kann die Mortalität bei Kindern bis zu 20% betragen. Bei frühzeitiger Erkennung und adäquater Behandlung kann die Mortalität jedoch auf ungefähr 1% gesenkt werden (Alejandria, 2015).

Deshalb ist es wichtig, in der zuvor beschriebenen kritischen Phase auf Warnsignale zu achten. Zu diesen gehören starke Bauchschmerzen, anhaltendes Erbrechen, Hyperventilation, Schleimhautblutungen oder blutiges Erbrechen, Erschöpfung oder Unruhe, Hämatokritanstieg und Thrombozytenabfall (WHO, 2020a, Magill et al., 2013).

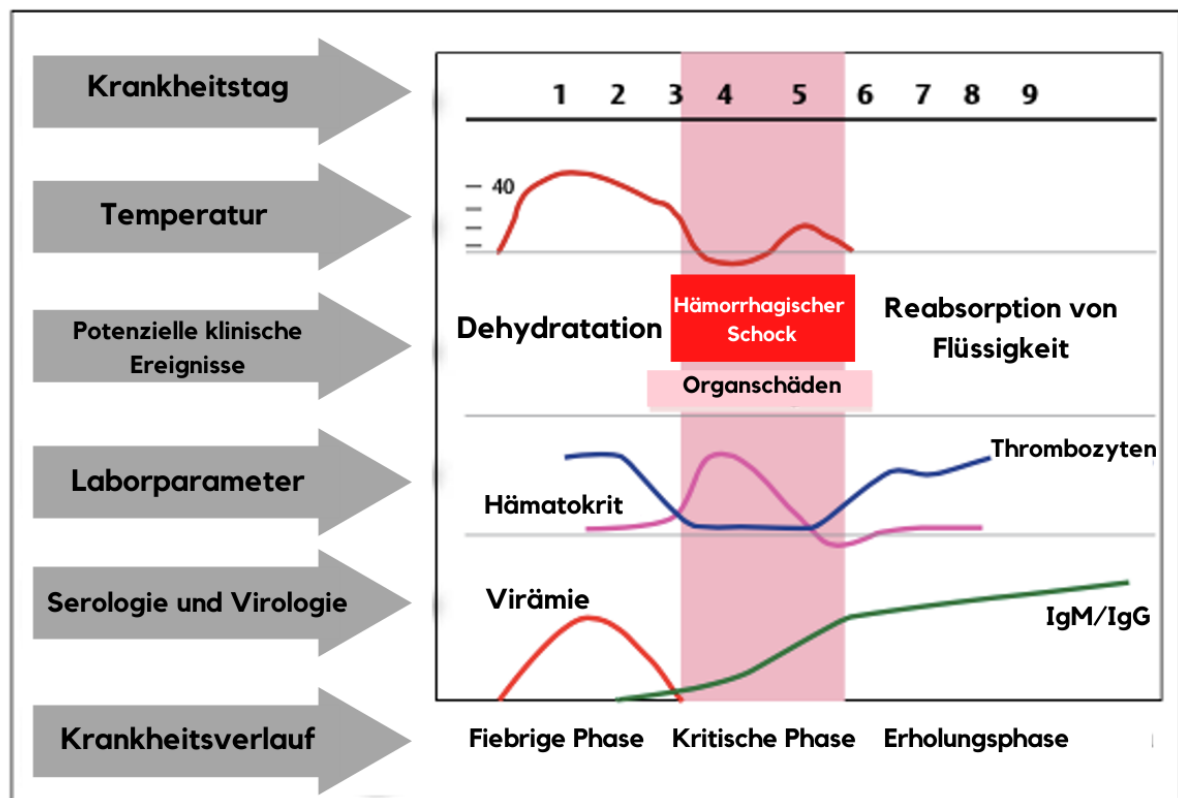


Abb.3: Krankheitsverlauf Dengue-Fieber, modifiziert nach (Yip, 1980)

2.3.1.5 Diagnostik

Klinisch kann Dengue vermutet werden, wenn eine Person in einem Endemiegebiet hohes Fieber (40°C) in Kombination mit 2 oder mehr der folgenden Symptome hat: Starke Kopfschmerzen, retrobulbäre Schmerzen, Arthralgien, Myalgien, Übelkeit, Erbrechen, Ausschlag, Lymphknotenschwellung (WHO, 2020a). Die Symptomatik hängt allerdings stark vom Stadium der Erkrankung ab. Darüber hinaus gibt es je nach geographischer Lage verschiedenste andere Erkrankungen, die ähnliche Symptome verursachen können. Dazu zählen zum Beispiel Gelbfieber, Malaria, Zika und Chikungunya. Um die Patienten trotzdem krankheitsspezifisch behandeln und betreuen zu können, sind Schnelltests und Labordiagnostik wichtige Ergänzungen zur klinischen Diagnostik (Muller et al., 2017, WHO, 2009).

Viele kommerzielle Dengue-Schnelltests beruhen auf dem Nachweis des viralen NS1-Antigens, das in allen vier Dengue-Serotypen stark konserviert ist. Es eignet sich

besonders gut für Schnelltests, da es in hohen Konzentrationen ins Blut sezerniert wird. Bei Erstinfektionen lässt sich NS1 ab dem Zeitpunkt des Symptombeginns etwa 8-10 Tage lang nachweisen.

Historisch gesehen ist die Virusisolation auf Zellkulturen die Nachweismethode der Wahl für DENV-Infektionen gewesen. Da sie sehr zeitaufwendig ist, wird sie mehr und mehr von RT-PCR-Verfahren abgelöst. RT-PCR-Methoden sind schnelle, sensitive und spezifische Nachweismethoden für virale RNA im Blut des Patienten. Leider sind die nötigen finanziellen und strukturellen Mittel für diese Techniken in vielen Endemiegebieten bislang nicht vorhanden (Meyer, 2019, Muller et al., 2017, Magill et al., 2013).

Zur Verbesserung der Diagnostik in ressourcenschwachen Gegenden werden vermehrt isothermale Diagnostikmethoden, wie zum Beispiel LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification), erforscht. Teoh et al. konnten zeigen, dass ihre LAMP in Kombination mit anderen Diagnostikmethoden hohe Spezifität und Sensitivität aufweist (Teoh et al., 2013).

Eine weitere wichtige Unterstützung zur klinischen Diagnostik ist die Serologie mittels IgM/IgG ELISA. In der Akutphase der Erkrankung, etwa nach 3-4 Tagen, lässt sich eine IgM-Antwort beobachten. IgG ist bei Primärinfektion etwa ab dem 7. Tag nachweisbar. Höhe und Anstieg der Titer können Aufschluss darüber geben, ob eine Primär- oder Sekundärinfektion vorliegt, was wiederum richtungsweisend für die Therapie sein kann. Allerdings können diese Werte durch Kreuzreaktivitäten mit anderen Flaviviren beeinflusst werden. Deshalb ist die Antikörper-Serologie in Gebieten, wo mehrere Flaviviren wie DENV, YFV oder ZIKV zirkulieren, kritisch zu betrachten (Meyer, 2019, Muller et al., 2017, Magill et al., 2013).

Im Falle von DENV dauert das Fieber in der Regel 2-7 Tage an (WHO, 2009, Rigau-Pérez et al., 1998). Das Virus kann besonders bei kurzen Fieberverläufen auch über den Zeitraum des Fiebers hinaus im Patientenblut persistieren (Muller et al., 2017). Um auch solche Patienten identifizieren zu können, wurden in dieser Arbeit Patienten in die Studie aufgenommen, wenn sie in den letzten 72h vor Untersuchung Fieber gehabt hatten.

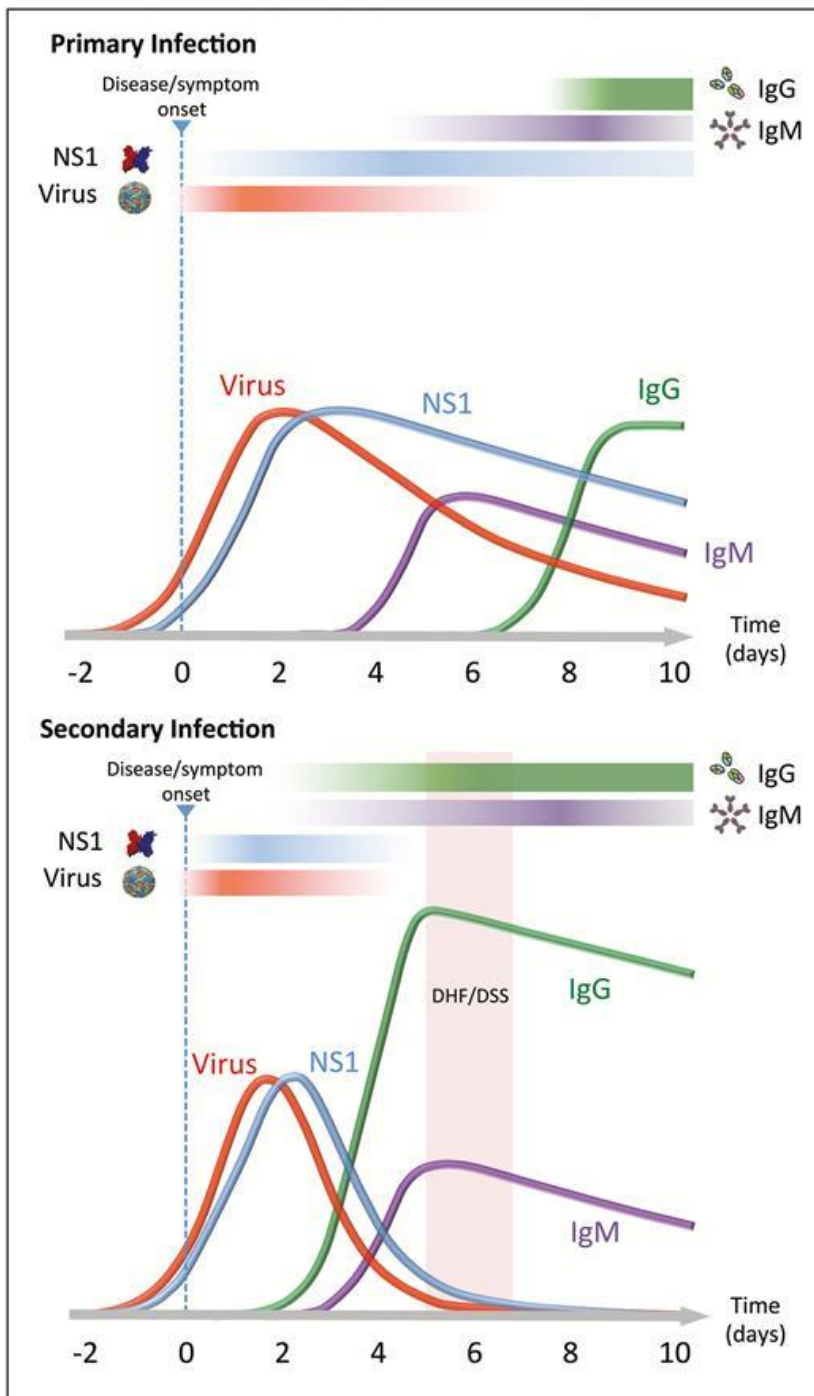


Abb.4: Auftreten verschiedener Biomarker in Patienten mit DENV-Infektion

Oberes Bild: Primärinfektion **Unteres Bild:** Sekundärinfektion

In beiden Bildern lässt sich zu Krankheitsbeginn ein Anstieg von Viruslast und NS1 erkennen. IgM steigt sowohl bei Primär- als auch bei Sekundärinfektion etwa ab dem 3. Tag und erreicht seinen Höhepunkt etwa am 5. Tag der Erkrankung.

Primärinfektion: Es bildet sich etwa ab dem 7. Tag IgG, die Viruslast und der NS1-Spiegel fallen kontinuierlich über den gesamten abgebildeten Zeitraum.

Sekundärinfektion: IgG bildet sich bereits um den 2. Infektionstag, zeigt einen starken Anstieg und höheres Maximum als bei Primärinfektion. NS1-Wert und Viruslast fallen bereits ab dem 2.-3. Tag stark ab. Die kritische Phase für schwere Verläufe beginnt um den 5. Tag. Sie ist gekennzeichnet durch maximale IgG-Spiegel bei gleichzeitig niedriger Viruslast und niedrigen NS1-Werten (Muller et al., 2017).

2.3.1.6 Therapie

Für Dengue gibt es bisher keine kausale antivirale Therapie. Die Behandlung erfolgt symptomorientiert. Wichtigstes Medikament zur Behandlung des klassischen Dengue-Fiebers ist Paracetamol. Es lindert Muskel- und Gelenkschmerzen und senkt das Fieber. Eine Dengue-Infektion kann sich, wie bereits beschrieben, als hämorrhagisches Fieber manifestieren und mit erhöhter Blutungsneigung einhergehen. Medikamente, die die Blutungsneigung zusätzlich erhöhen, sind deshalb nicht zur Behandlung des Dengue-Fiebers geeignet. Aus diesem Grund ist die Verwendung von sogenannten NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs), wie Ibuprofen oder Acetylsalicylaten, kontraindiziert. Weiterhin sollte bei einer klassischen Dengue-Infektion auf ausreichend orale Flüssigkeitszufuhr geachtet und Ruhe verordnet werden (WHO, 2020a, Magill et al., 2013, Meyer, 2019).

Um ein hämorrhagisches Dengue-Fieber frühzeitig zu erkennen, sollten Patienten und Angehörige über die Warnsignale aufgeklärt werden. Bei Auftreten der Warnsignale, wie Anzeichen von Plasmaleckagen, Blutdruckabfall oder Blutungen, sollten sich die Patienten umgehend in medizinische Behandlung begeben. Dasselbe gilt für Patienten, die andere relevante Komorbiditäten aufweisen. Der wichtigste Grundsatz in diesen Fällen ist die engmaschige Überwachung des Patienten, besonders in Bezug auf Hämatokrit, Blutdruck und Pulsamplitude. Bei Patienten, die eine erhöhte endotheliale Permeabilität aufweisen, besteht die Gefahr der Organminderperfusion und des Kreislaufstillstands. Wenn Patienten nicht ausreichend oral Flüssigkeit zu sich nehmen können oder der Hämatokrit rasch abnimmt, sollte Flüssigkeit intravenös verabreicht werden. Auch im Falle eines DSS ist das Flüssigkeitsmanagement die wichtigste Säule der Therapie. Die Flüssigkeitsgabe sollte dennoch unter strenger Kontrolle erfolgen, da eine Flüssigkeitsüberladung und die daraus resultierende Hypervolämie zu schweren Komplikationen führen kann. Weiterhin kann im Schockzustand die Gabe von Thrombozytenkonzentraten oder fresh-frozen plasma lebensrettend sein (Magill et al., 2013, Simmons et al., 2012).

Schwere Dengue-Verläufe haben eine hohe Mortalität. Eine adäquate Therapie durch erfahrenes Personal kann die Mortalität auf weniger als 1% senken (WHO, 2020a).

2.3.1.7 Prävention

Es gibt zwei hauptsächliche Standbeine zur Prävention der Übertragung von Dengue. Zum einen besteht die Möglichkeit, den Kontakt zwischen Mensch und Vektor so gering wie möglich zu halten. Dies gelingt vor allem durch den Gebrauch von Repellenzien, langer Kleidung und Mückennetzen vor Fenstern und über Schlafstätten. Auch Schulungen der in Endemiegebieten lebenden Bevölkerung zur Übertragung von Dengue sind von Bedeutung. *Aedes*-Mücken vermehren sich häufig in urbaner und peri-urbaner Umgebung in von Menschen geschaffenen Wasserreservoirs. Dazu zählen zum Beispiel alte Autoreifen, in denen sich Wasser sammelt, Blumenvasen und Wasserbassins. Mit der Reduktion menschengeschaffener Brutplätze kann die Bevölkerung einen wichtigen Beitrag zur Eindämmung der Mückenpopulation leisten. Das andere Standbein ist eine effektive Vektorkontrolle. Es gibt mehrere Verfahren zur Verringerung der Verbreitung von *Aedes*. Sowohl Larven als auch adulte Mücken können mit Pestiziden getötet werden. Die Larvenpopulation kann außerdem durch die Verbreitung larvenfressender Krebse oder Fische eingedämmt werden. Andere Verfahren beruhen zum Beispiel auf der DENV-Immunsierung der Mücken durch *Wolbachia*-Bakterien (Magill et al., 2013, Meyer, 2019, WHO, 2020a, WHO, 2009, Bos et al., 2018).

Des Weiteren gibt es eine zugelassene DENV-Impfung „Dengvaxia®“. In Auswertungen der Daten zeigte sich eine gute Wirksamkeit für 9- bis 45-jährige Patienten, die bereits mindestens einmal an Dengue erkrankt waren. Personen, die zum Zeitpunkt der Impfung noch keinen Kontakt mit DENV gehabt hatten, hatten ein deutlich erhöhtes Risiko schwere Dengue-Verläufe zu entwickeln. Deshalb empfiehlt die WHO eine Impfung mit Dengvaxia® nur Personen, die nachweislich mindestens eine DENV-Infektion gehabt haben (WHO, 2020a, Thomas and Yoon, 2019).

2.3.1.8 Dengue in Tansania

Die Datenlage zur genauen Verbreitung von Dengue in Tansania ist ungenügend. Trotzdem gibt es zahlreiche Berichte über Dengue-Ausbrüche und Übertragung von Dengue in Tansania (Boillat-Blanco et al., 2018, Mboera et al., 2016, Okada et al., 2019). Auch eine systematische Literaturanalyse von 2017 kommt zu dem Schluss, dass es in Tansania andauernde Dengue-Aktivität gibt (Ward et al., 2017).

2.3.1.9 Dengue in Kolumbien

Dengue ist in Kolumbien ein Problem der öffentlichen Gesundheit. Übertragungen und Todesfälle werden seit Jahrzehnten beobachtet (Chaparro-Narváez et al., 2016, Gutierrez-Barbosa et al., 2020, Villar et al., 2015, López-Montenegro et al., 2019).

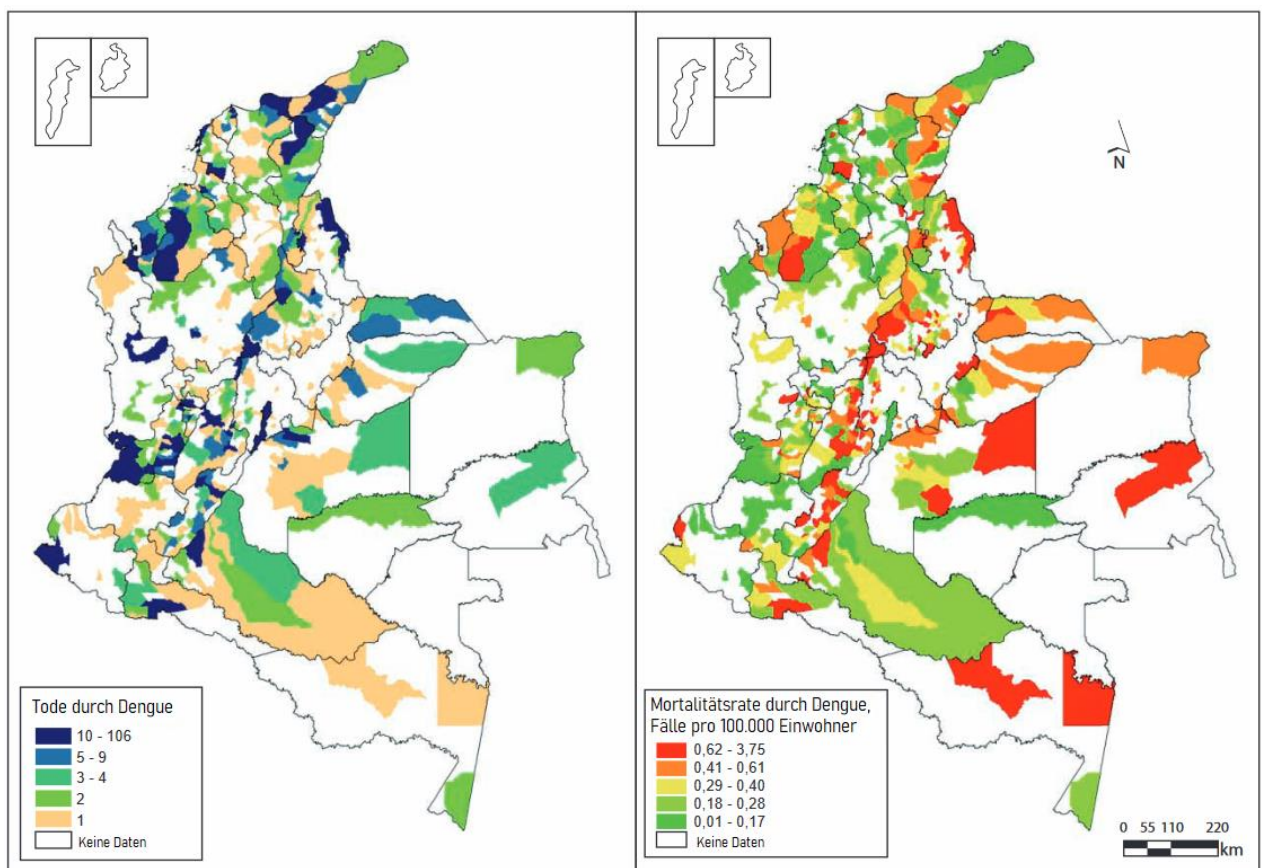


Abb.5: Mortalität durch Dengue in kolumbianischen Gemeinden (1985-2012)

Links: Absolute Zahlen

Rechts: Mortalitätsrate pro 100.000 Einwohner

Modifiziert nach: (Chaparro-Narváez et al., 2016)

2.3.2 Andere Flaviviren

Abgesehen von DENV können auch andere Flaviviren Krankheiten und Epidemien verursachen. Dazu gehören zum Beispiel das Gelbfieber-Virus, Zika-Virus und West-Nile-Virus (Meyer, 2019).

2.3.2.1 Gelbfieber-Virus

Auch YFV wird von weiblichen Stechmücken der Gattung *Ae. aegypti* übertragen. Weitere wichtige Vektoren sind *Haemagogus*- und *Sabethes*-Mücken (Meyer, 2019). Das Virus ist in 47 Ländern Afrikas, Zentral- und Südamerikas endemisch. Obwohl es seit Mitte des 20. Jahrhunderts eine sichere, effektive und günstige Impfung gegen Gelbfieber gibt (WHO, 2019), kommt es immer wieder zu regionalen Ausbrüchen. So infizierten sich im Zeitraum von 2016-2018 in Brasilien mehr als 2000 Menschen mit Gelbfieber, mehr als 700 Personen starben (Chen and Wilson, 2020). Der Grund, warum das Virus durch die Impfung nicht ausgerottet werden kann, ist, dass es in einem enzootischen Zyklus fortbesteht, in welchem es Primaten und Vektoren als Reservoir nutzt (Meyer, 2019). Kommen nicht-immune Menschen oder urbane Vektoren wie *Ae. aegypti* durch unkontrollierte Waldabholzung oder Siedlungsbau mit dem enzootischen Zyklus in Berührung, kann es zu einem Ausbruch kommen (Chippaux and Chippaux, 2018).

Ähnlich wie bei Dengue verläuft die Erkrankung in vielen Fällen symptomlos, kann sich aber auch als akutes febriles Syndrom mit Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, Übelkeit und Erbrechen manifestieren (WHO, 2019). In den meisten Fällen klingen die Symptome nach etwa 4 Tagen ab und die Patienten genesen. Ein kleiner Teil der Infizierten jedoch kommt danach in die toxische Phase, oft gekennzeichnet durch Hämorrhagie und multiple Organbeteiligung. Dabei kommt es auch vermehrt zur Ausbildung eines Ikterus, was der Erkrankung ihren Namen gibt. Die Wahrscheinlichkeit, in der toxischen Phase zu versterben, liegt laut WHO bei etwa 50% (Meyer, 2019, WHO, 2019).

2.3.2.2 Zika-Virus

Das Zika-Virus wurde 1947 in Uganda entdeckt (Dick et al., 1952). Lange Jahre wurde ihm wenig Aufmerksamkeit zuteil, da die meisten Infektionen asymptomatisch oder nur mit milden Symptomen verlaufen, die denen einer DENV- oder CHIKV-Infektion ähneln. 2007 kam es zum ersten größeren Ausbruch auf der Insel Yap in Mikronesien. Es folgte ein Ausbruch in Französisch-Polynesien 2013-2014, bei dem ZIKV-Infektionen mit dem Auftreten von Guillain-Barré-Syndrom in Verbindung gebracht wurden. 2015 kam es zu einem Ausbruch in Brasilien. Dabei wurden Fälle von Mikrozephalie in Neugeborenen beobachtet, deren Mütter während der Schwangerschaft mit ZIKV infiziert gewesen waren. ZIKV breitete sich in der Folge rasch aus. Bereits Anfang 2016 wurden in über 20 Ländern Nord- Mittel- und Südamerikas lokale Übertragungen der Erkrankung gemeldet. Auch ZIKV wird hauptsächlich von *Ae. aegypti* und anderen *Aedes*-Mücken übertragen. Zudem gilt ZIKV auch als sexuell übertragbar und konnte in Samenflüssigkeit nachgewiesen werden (Kindhauser et al., 2016, Musso et al., 2015).

2.3.2.3 West-Nile-Virus

Das West-Nile-Virus (WNV) ist ein neurotropes Virus, das erstmals 1937 aus dem Blut einer ugandischen Patientin isoliert wurde (Smithburn et al., 1940). Das Virus zirkuliert in der Natur normalerweise in Stechmücken, besonders der Gattung *Culex*, und in Vögeln. Durch Migrationsbewegungen infizierter Vögel hat es sich auf allen Kontinenten mit Ausnahme der Antarktis ausgebreitet und ist heute das am weitesten verbreitete Arbovirus der Welt (Kramer et al., 2008, Charrel et al., 2003, Reiter, 2010). Während Stechmücken und Vögel die Hauptwirte des Virus sind, befällt es gelegentlich auch Säugetiere wie Pferde und Menschen (Pupo et al., 2006). Eine Infektion mit WNV verläuft in Menschen meist asymptomatisch. Einige Patienten entwickeln allerdings ein unspezifisches akut-fiebriges Syndrom. Darüber hinaus kommt es bei etwa 1 von 150 Personen zur viralen Neuroinvasion, was zu Meningoenzephalitiden und zahlreichen neurologischen Ausfallerscheinungen bis hin zum Tod führen kann (Hayes et al., 2005, Reiter, 2010, Mostashari et al., 2001).

2.3.3 Togaviren

Das Chikungunya-Virus (CHIKV), das O'nyong-nyong-Virus und das Semliki-Forest-Virus (SFV) sind Alphaviren aus der Familie der Togaviren (Briolant et al., 2004, Bessaud et al., 2006).

2.3.3.1 Chikungunya-Virus

Das CHIKV wurde Mitte des 20. Jahrhunderts erstmals im heutigen Tansania beschrieben und ist mittlerweile weltweit verbreitet. Autochthone Übertragungen finden hauptsächlich in Afrika, Asien, Zentralamerika und in der Region des Indischen Ozeans statt (Robinson, 1955, Horwood and Buchy, 2015, Thiberville et al., 2013). 2014 kam es zu einem Ausbruch mit autochthoner Übertragung in Montpellier, Frankreich (Delisle et al., 2015).

Im Gegensatz zu vielen anderen arboviralen Erkrankungen entwickeln die meisten CHIKV-infizierten Patienten Symptome. Neben Fieber sind besonders schwere Arthralgien charakteristisch für Chikungunya. Diese Arthralgien können für Monate nach der Infektion persistieren und schränken die Lebensqualität der Betroffenen erheblich ein (Robinson, 1955, Thiberville et al., 2013, Vu et al., 2017).

2.3.3.2 O'nyong-nyong-Virus

Der erste große Ausbruch von ONNV wurde 1959 in Uganda beobachtet. Die Krankheit wurde damals als Dengue-ähnliche Erkrankung beschrieben. Häufige Symptome sind Fieber, Kopfschmerzen, starke Gelenk- und Muskelschmerzen sowie Ausschlag (Haddow et al., 1960, Kiwanuka et al., 1999). Im Gegensatz zu vielen anderen arboviralen Erkrankungen und ähnlich wie bei Malaria, sind Mücken der Gattung *Anopheles* die hauptsächlichsten Überträger von ONNV (Williams et al., 1965, Rezza et al., 2017). Die Verbreitung von ONNV ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau bekannt und erfordert weitere Untersuchungen (Rios-González, 2017, Rezza et al., 2017).

2.3.3.3 Semliki-Forest-Virus

Das Semliki-Forest-Virus (SFV) kann, ähnlich wie ONNV und CHIKV, in Menschen eine akut-fiebrige Erkrankung auslösen. Bei einem Ausbruch 1987 in der Zentralafrikanischen Republik waren häufige Symptome Fieber, Muskelschmerzen, Gelenkschmerzen und Abgeschlagenheit (Mathiot et al., 1990). Auch ein Fall, bei dem ein Patient in Folge einer SFV-Infektion eine Enzephalitis entwickelte und verstarb, ist dokumentiert (Willems et al., 1979). SFV ist endemisch in verschiedenen Regionen Afrikas. Die genaue Ausbreitung ist jedoch bisher nicht bekannt (Briolant et al., 2004, Lundström, 1999, LaBeaud et al., 2015, Tigoï et al., 2015).

2.3.4 Rift-Valley-Fever-Virus

Das zu den Bunyaviren gehörende Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV) verursacht vornehmlich schwere Erkrankungen bei Nutztieren, kann jedoch auch eine fiebrige Erkrankung beim Menschen hervorrufen. Sowohl der wirtschaftliche Schaden als auch die gesundheitlichen Folgen für Mensch und Tier machen das RVFV zu einer ernstzunehmenden Bedrohung. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt entweder über Kontakt mit infiziertem Gewebe oder Körperflüssigkeiten der Tiere oder über infizierte Stechmücken, hauptsächlich *Culex spp.* und *Aedes spp.* (Pepin et al., 2010, Linthicum et al., 2016, Chevalier et al., 2010, Mansfield et al., 2015). Eine Infektion verläuft bei Menschen häufig asymptomatisch oder als leichte grippeähnliche Erkrankung. Das RVFV kann jedoch auch schwere, teilweise tödliche, Komplikationen, wie Hämorrhagie, Organversagen und Meningoenzephalitiden, auslösen. Des Weiteren sind neurologische Spätfolgen wie Erblinden und Paresen beschrieben (Adam et al., 2010, Balkhy and Memish, 2003, Chevalier et al., 2010, Al-Hazmi et al., 2003). Das RVFV kommt bislang hauptsächlich in Afrika und im Nahen Osten vor, besitzt allerdings das Potenzial, sich auf andere Kontinente, wie zum Beispiel Europa, auszubreiten (Chevalier et al., 2010, Linthicum et al., 2016, Mansfield et al., 2015, Pepin et al., 2010).

2.4 Studienort Kolumbien

Kolumbien ist ein Land in Südamerika, das im Norden an das Karibische Meer und im Westen an den Pazifik grenzt. Auf einer Fläche von rund 1,138,910 km² leben etwa 49 Millionen Menschen (Stand 2020). Das Klima ist an den Küsten und im Flachland tropisch und kühler in höher gelegenen Regionen. Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt 76,6 Jahre und die Fertilitätsrate liegt bei etwa 1,94 Kindern pro Frau (Stand 2020) (CIA, 2020).



Abb. 6: Karte von Kolumbien (CIA, 2020)

2.4.1 Quibdó

Quibdó ist die Hauptstadt des Departements Chocó, welches in der Pazifikregion Kolumbiens liegt. Die Region hat mit Armut und einem schwachen Gesundheitssystem zu kämpfen. Diese Aspekte in Kombination mit feucht-heißem, tropischen Klima bieten gute Voraussetzungen für die Übertragung tropischer Infektionskrankheiten wie Dengue (Berta Nelly Restrepo and Katherine Marín, 2015).

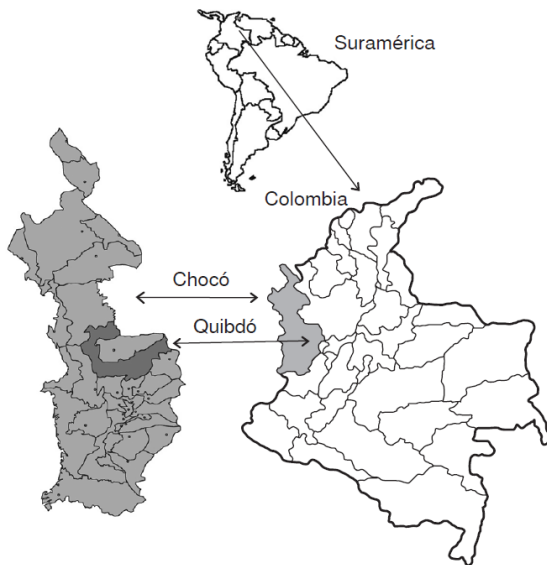


Abb.7: Lage Quibdó, Chocó, Kolumbien (Berta Nelly Restrepo and Katherine Marín, 2015)

2.4.2 Apartadó

Apartadó liegt im Nordosten Kolumbiens, am Golf von Urabá im Departement Antioquia. Urabá ist Endemiegebiet verschiedener akuter Fiebererkrankungen infektiöser Natur (Arroyave et al., 2013). Das Klima in Urabá ist subtropisch feucht (Codazzi, 2002).

2.4.3 Turbo

Turbo liegt nicht weit entfernt von Apartadó, ebenfalls in der Region Urabá. Turbo hat etwa 135.000 Einwohner, von denen mehr als die Hälfte in ländlichen Arealen lebt. Wie bereits zuvor beschrieben, ist die Region Urabá Endemiegebiet von Malaria und anderen Infektionskrankheiten (Altamiranda-Saavedra et al., 2018, Arroyave et al., 2013, Zuluaga-Idárraga et al., 2016).

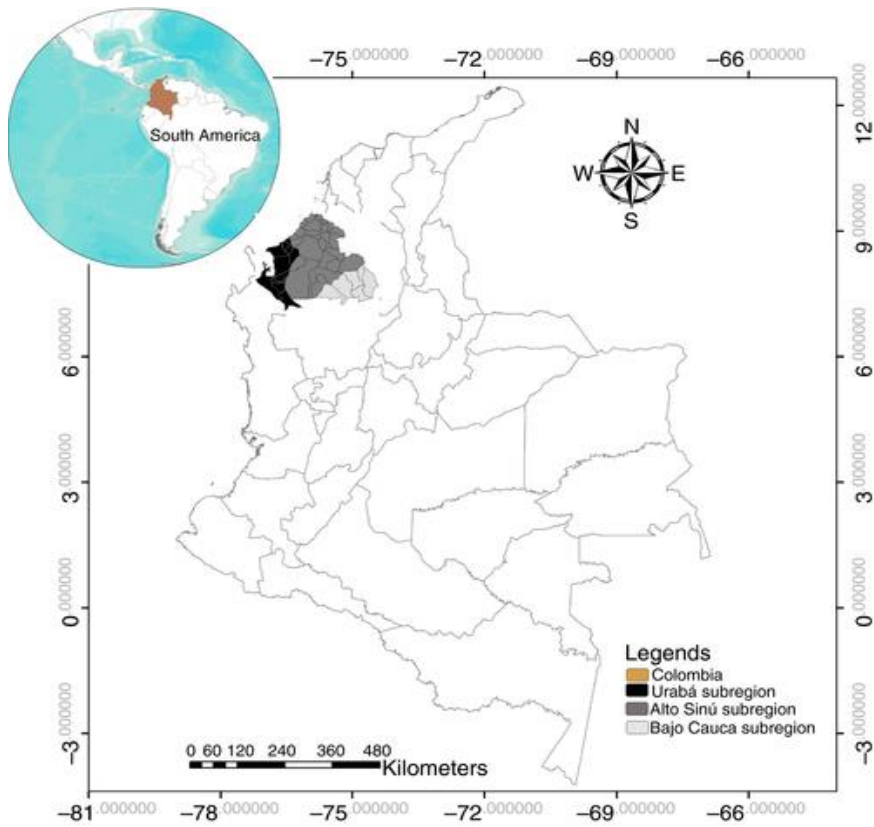


Abb.8: Lage der Region Urabá in Kolumbien (Altamiranda-Saavedra et al., 2018)

2.5 Forschungsfragen

Um die in der AG Gehring entwickelte m-RT-PCR-ELISA-Methode hinsichtlich ihrer Funktionsweise zu überprüfen, wurden Patientenproben damit ausgewertet. Mit dieser Aufgabe wurden bereits mehrere Doktoranden der Universitätsmedizin Mainz beauftragt. Der ursprüngliche Rekrutierungsort für Patienten war Tansania. An verschiedenen Orten wurden in der Zeit von April 2016 bis April 2019 rund 900 Patientenproben asserviert und analysiert (Daniel, 2019a, Eckert, 2019, Huth, 2021, Koliopoulos, 2019).

Dabei konnte mit der m-RT-PCR-ELISA-Methode regelhaft Malaria nachgewiesen werden. Es wurden jedoch weder DENV noch einer der anderen 7 Erreger des Panels nachgewiesen (Daniel, 2019a, Koliopoulos, 2019, Huth, 2021, Eckert, 2019). Aus diesen Vorerfahrungen wurden für dieses Projekt folgende Forschungsfragen abgeleitet:

1. Zirkulieren arbovirale Erreger akut fiebriger Syndrome (insbesondere DENV) zum Untersuchungszeitpunkt an den designierten Studienorten?
2. Kann die im Labor der AG Gehring entwickelte m-RT-PCR-ELISA arbovirale Erreger, insbesondere DENV, aus Patientenplasma nachweisen?
3. Ist eine Whatman 903 Protein Saver Card eine alternative Konservierungsmethode, die einen Virusnachweis mittels m-RT-PCR-ELISA ermöglicht?

2.6 Hypothesen

Aus den obigen Forschungsfragen wurden folgende Hypothesen formuliert:

1. Im designierten Forschungszeitraum zirkulieren arbovirale Erreger an den drei Studienorten in Kolumbien.
2. Aus den dort entnommenen Plasmaproben lassen sich mit Hilfe der m-RT-PCR-ELISA arbovirale Erreger nachweisen.
3. Die Whatman 903 Protein Saver Card ist eine alternative Konservierungsmethode und kann als Ausgangsmedium für die Isolation und Amplifikation arboviraler RNA mittels m-RT-PCR-ELISA dienen.

3 Material & Methoden

3.1 Material

Tabellen 1-10 bearbeitet und modifiziert nach Daniel, Tim Willi: „Etablierung einer Multiplex-PCR zur Diagnostik von arboviralen Infektionen und Malaria“ (Daniel, 2019a).

Tabelle 1: Verwendetes Material, Allgemeines

Allgemeines		
Handschuhe	SATRA	Northamptonshire, UK
Pipetten	Eppendorf Research	Hamburg, DE
Pipettenspitzen	2-100µl & 100-1000µl: Biosphere Filter Tips, Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, DE
	0,5-10µl: Greiner bio-one	Kremsmünster, AU
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, DE
Aqua, dest.	B. Braun	Melsungen, DE
Reaktionsgefäße und Mikroröhren versch. Größen	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, DE
Aufbewahrungsboxen Mikroröhren + Einsätze	Ratiolab	Dreieich, DE
Nukleasefreies Wasser, steril und autoklaviert, DEPC-behandelt (im Folgenden als H₂O bezeichnet)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE

Tabelle 2: Verwendetes Material und Reagenzien für die Nukleinsäureisolation der Proben

Nukleinsäureisolation		
Binding Buffer	Roche Diagnostics: High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Mannheim, DE
Poly(A)		
Proteinase K		
Inhibitor Removal Buffer		
Wash Buffer		
Elution Buffer		
High Pure Filter Tubes		
Collection Tubes		
Ethanol, 100%ig	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE
Isopropanol	Merck AG	Darmstadt, DE

Tabelle 3: Material zur Probengewinnung und Probenaufbewahrung in Kolumbien

Probengewinnung Kolumbien		
Digital-Fieberthermometer	Med Comfort (AMPri)	Winsen, DE
Vacutainer Kanülen	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, DE
EDTA-Röhrchen 4ml	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, DE
Whatman 903 Protein Saver Card	Whatman, GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Plastic ziploc bag 4x6in.	Whatman, GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Desi Dry 5g Silica Gel Säckchen mit Indikator	ThoMar OHG	Lüttau, DE
Malaria-Schnelltest SD BIOLINE Ag P.f/P.v	Standard Diagnostics, Abbott Laboratories	Chicago, USA
Dengue NS1-Schnelltest Panbio® Dengue Early Rapid	Panbio Ltd, Abbott Laboratories	Chicago, Illinois, USA
Unistik 3 Extra (21G) Lanzetten	Owen Mumford Ltd.	Woodstock, Oxfordshire, UK
Mikro-Schraubröhre 2ml, 0,5ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, DE
RNAlater™ Stabilization Solution	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 4: Verwendetes Material für die Eluierung der Filterkarten

Eluierung Filterkarten		
Biopsiestanze (Ø3mm)	Kai Europe GmbH	Solingen, DE
Stanzmatte	Whatman, GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Roti-Nukleinsäurefrei	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
70% Ethanol	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE
Cellstar Tubes 50ml, sterile	Greiner bio-one	Kremsmünster, AU

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien für die Reverse Transkription

Reverse Transkription		
dNTPSet PCR Grade, dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Diagnostics	Mannheim, DE
5x First Strand Buffer	Invitrogen	Carlsbad, CA USA
0,1M DTT	Invitrogen	Carlsbad, CA USA
Hexanukleotide Mix, 10x conc.	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
Recombinant RNasin, Ribonuclease Inhibitor	Promega	Madison, WI USA
Super Script II Reverse Transcriptase 200U/µl	Invitrogen EC-Nummer 2.7.7.49	Carlsbad, CA USA

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien für die Singleplex- und Multiplex-PCR

Singleplex- und Multiplex-PCR		
Nukleasefreies Wasser, steril und autoklaviert, DEPC- behandelt	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
10x AccuPrime PCR Buffer I	Invitrogen	Carlsbad, CA USA
Digoxigenin-11-dUTP	Jena Bioscience	Jena, DE
AccuPrime Taq DNA Polymerase	Invitrogen EC-Nummer 2.7.7.7	Carlsbad, CA USA
PrimerMix	siehe Tabelle 16	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific

Tabelle 7: Verwendetes Material und Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese		
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH	Hess. Oldendorf, DE
0,5x TBE Puffer	Siehe Tabelle 10: Angesetzte Lösungen und Puffer	
Ethidiumbromid 0,95mg/ml	Sigma Chemie GmbH	Deisenhofen, DE
Längenstandard, pUC19 DNA/Mspl (HpalI)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA US
6xDNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA US
Parafilm Laboratory Film	Bemis Company	Neenah, US
Nitrilhandschuhe	Microflex	Reno, NV US

Tabelle 8: Verwendetes Material und Reagenzien für die ELISA-Hybridisierung

ELISA-Hybridisierung		
Hybridization Buffer	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
Sonden, 100pmol/μl, siehe Tabelle 13	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
Mini-Röhren 5 + 10ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, DE
StreptaWell High Bind, transparent, 12x8-well	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
Combitips advanced 5ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Cellstar Tubes 50ml, sterile	Greiner bio-one	Kremsmünster, AU
Denaturierungslösung	Siehe Tabelle 9: Angesetzte Lösungen und Puffer	
Konjugatpuffer		
ABTS-Puffer		

Tabelle 9: Angesetzte Lösungen und Puffer

Angesetzte Lösungen und Puffer	
Denaturierungslösung ELISA	Aqua als Basis 0,2N NaOH (bezogen von AppliChem) 0,1% SDS (bezogen von AppliChem)
Konjugatpuffer ELISA	Aqua als Basis 100mM Tris HCl (bezogen von Sigma) 150mM NaCl (bezogen von Roth) Zu dieser Lösung im Verhältnis 1:5000 anti-DIG-POD, Roche Diagnostics (1µl je 5ml Konjugatpuffer)
ABTS-Puffer ELISA	45ml Aqua 5ml ABTS Buffer (Roche Diagnostics) 1 ABTS-Tablette (Roche Diagnostics)
TBE-Puffer 0,5x	950ml Aqua 50ml 10x TBE-Puffer (Invitrogen)

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Geräte		
Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Thermomixer	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Vortex Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, DE
UV Sterilizing PCR Workstation	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen, DE
Zentrifuge (5424, 2ml Rörchen)	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Thermo-Cycler PTC-200 (RT+PCR)	GMI Inc.	Ramsey, MN USA
Mikrozentrifuge (Pico 17, PCR-Tubes)	Heraeus, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Waage	As Wägetechnik	Garching, DE
Elektrophorese-Einheit incl. Kammer, Schlitten + Käme	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, DE
Geldokumentation: UV-Transilluminator + Fotodrucker	Biometra GmbH	Göttingen, DE
Brutschrank (ELISA-Platten)	Heraeus, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
ELISA Washer + Reader	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Erlenmeyer Kolben 200/500ml	Simax	Prague, CZ

3.2 Methoden

3.2.1 Studienorte

Insgesamt wurden drei Orte in Kolumbien als Studienorte ausgewählt:

- ❖ Departement Chocó – Quibdó, *Hospital Ismael Roldán Valencia*
- ❖ Departement Antioquia – Apartadó, *Clínica Antonio Roldán Betancur*
- ❖ Departement Antioquia – Turbo, *Hospital Francisco Valderrama*

Die AG Malaria der Universidad de Antioquia unterhält an allen drei Studienorten Kooperationen mit Ärzten und Einrichtungen. Zirkulation von DENV ist in diesen Regionen beschrieben (Arroyave et al., 2013, Berta Nelly Restrepo and Katherine Marín, 2015).

3.2.1.1 Studienort 1: Quibdó, *Hospital Ismael Roldán Valencia*

Das Hospital Ismael Roldán Valencia ist eine öffentliche Gesundheitseinrichtung in Quibdó. Es gibt eine 24h Notaufnahme, eine ambulante allgemeinmedizinische Versorgung sowie einen stationären Bereich, unter anderem mit gynäkologischer und pädiatrischer Abteilung. Der Großteil der Patienten kommt in die Notaufnahme, wo eine Registrierung durch das Krankenpflegepersonal erfolgt. Zur Diagnostik von Patienten mit Fieberanamnese wurde zum Zeitpunkt der Studie vom Krankenhaus selbst routinemäßig die dicke Blutstropfendiagnostik angeboten. Diese wurde von geschulten Kräften im krankenhauseigenen Labor durchgeführt. Es gab zu dieser Zeit krankenhausesintern weder die Möglichkeit einer molekularen noch einer Schnelltest-Diagnostik für Erreger fieberhafter Erkrankungen.

3.2.1.2 Studienort 2: Apartadó, *Clínica Antonio Roldán Betancur*

Die *Clínica Antonio Roldán Betancur* liegt in Apartadó und verfügt über eine 24h Notaufnahme, ein Labor und einen stationären Bereich. Auf demselben Campus befindet sich außerdem ein Posten des Tropeninstituts der Universität CES (Instituto Colombiano de Medicina Tropical ICMT). Dort gibt es die Möglichkeit der molekularen Diagnostik verschiedener Infektionskrankheiten. Aus strukturellen Gründen gibt es allerdings keine Routineanwendung dieser Diagnostikmöglichkeiten.

3.2.1.3 Studienort 3: Turbo, *Hospital Francisco Valderrama*

Auch im Hospital Francisco Valderrama gab es zur Zeit der Studie eine 24h Notaufnahme, einen stationären Teil und ein klinisches Labor. Die moderne Ausstattung des Labors erlaubte es, molekulare Tests für gängige Infektionskrankheiten wie Dengue, Malaria oder Leptospirose durchzuführen.

3.2.2 Studienpopulation

3.2.2.1 Inklusionskriterien

Um ein breites Spektrum febriler Erkrankungen zu testen, wurde als Inklusionskriterium lediglich Fieber in den letzten 72h vor Untersuchung definiert.

3.2.2.2 Exklusionskriterien

Ausschlusskriterium war das Vorliegen von apparenten Fieberursachen, beispielsweise akute Otitis media, Pharyngo-Amygdalitis, Haut- und Weichteilinfektionen, die sich mittels Anamnese und körperlicher Untersuchung nachweisen ließen. Ein Einschluss in die Studie konnte erwogen werden, falls die Patienten nicht mit Verbesserung der Symptomatik auf die krankheitsübliche Therapie reagierten.

3.2.2.3 Ethische Gesichtspunkte

Dieses Projekt entstand in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Malaria der Universidad de Antioquia (im Folgenden UdeA), die das Projekt patronisiert, und die Kontakte zu den Krankenhäusern und Verantwortlichen vor Ort herstellte. Der Ethikrat der UdeA billigte die Arbeit am Patienten und die Inklusion in die Studie unter folgenden Voraussetzungen:

Patientenalter > 2 Jahre.

Einwilligung in eine von der Ethikabteilung bewilligte Einverständniserklärung. Es waren zwei Einverständniserklärungen vorhanden, eine für Erwachsene und eine für Minderjährige und deren Sorgeberechtigte. Diese Formulare sowie das Protokoll der Ethikkommission finden sich im Anhang.

3.2.3 Anamnese und klinische Untersuchung der Patienten

Die in die Studie aufgenommenen Patienten wurden nach einem von der Universidad de Antioquia bereitgestellten Fragebogen befragt und anschließend körperlich untersucht.

Die wichtigsten Endpunkte dabei waren:

- Klinische Symptome
- Vitalparameter
- Soziodemographische Eigenschaften

Die Bedingungen für die Erhebung dieser Daten waren dabei sehr unterschiedlich. Am ersten Studienort, Quibdó, kam der Großteil der Patienten in ein der Klinik angegliedertes Labor. Dort wurden die Blutproben entnommen. Dann wurden die Patienten in ein Arztzimmer gebracht und dort untersucht. Sowohl die notwendige Zeit als auch die benötigten Gerätschaften wie eine Waage, Blutdruckmanschette und ein Computer mit der Anamnese-Datenbank waren vorhanden. Vereinzelt gab es dort stationäre Patienten, bei denen nicht alle Werte erhoben werden konnten, weil sie zum Beispiel nur zu einer kurzen Anamnese und Untersuchung im Stande waren.

An den anderen beiden Studienorten herrschten weniger gute Bedingungen zur Datenerhebung als in Quibdó. In Apartadó war der Standort die Klinik Antonio Roldán Betancur. Die Ärzte waren in der Stadt gut vernetzt, was dazu führte, dass man benachrichtigt wurde, wenn es in einem der anderen Krankenhäuser der Stadt einen geeigneten Patienten gab. Die Patienten wurden bei Benachrichtigung aufgesucht und vor Ort untersucht. Das hatte häufiger zur Folge, dass nötige Gerätschaften und ausreichend Zeit für die Anamnese nicht vorhanden waren. Ähnlich war es in Turbo im Hospital Francisco Valderrama. Dort wurde den Patienten in der Regel in der Notaufnahme Blut abgenommen. Um die Abläufe des Krankenhauses nicht zu behindern, mussten die meisten körperlichen Untersuchungen und Anamnesen aus Platz- und Zeitgründen im überfüllten Warteraum der Notaufnahme stattfinden. Die vorangehend beschriebenen unterschiedlichen Bedingungen in der Datenerhebung führten dazu, dass nicht bei allen Patienten alle Endpunkte bestimmt werden konnten.

3.2.4 Probenentnahme, Aufbewahrung und Transport

3.2.4.1 Venöses Blut

Nach Einwilligung zur Teilnahme wurde jedem Patienten 4ml venöses Blut mit einem EDTA-Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde zentrifugiert und anschließend wurden 2x 200µl Plasma abpipettiert. Die 200µl Plasma wurden jeweils in eine Mikroschraubröhre pipettiert, in die zuvor 500µl RNAlater™ Stabilization Solution abgefüllt worden war. Das Gemisch wurde bei -20°C im Gefrierschrank des jeweiligen Labors aufbewahrt. Nach Abschluss des Aufenthalts wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bei -195,8 °C in das Labor der Arbeitsgruppe Malaria der UdeA geschickt und dort bei -80°C gelagert. Ein Exemplar des konservierten Patientenplasmas verblieb vor Ort im Besitz der AG Malaria der UdeA. Ein weiteres Exemplar wurde als Ausgangsmaterial für die molekulare Untersuchung zur AG Gehring nach Deutschland geschickt. Die Proben wurden hierfür in einem isolierten Paket auf Trockeneis versandt.

3.2.4.2 Getrocknetes Blut auf Filterkarten

Vor der Zentrifugierung des venösen Blutes wurden 5 Kreise der Whatman 903 Protein Saver Card mit Blut beträufelt. Die Karten wurden anschließend zum Trocknen ausgelegt und am nächsten Tag zusammen mit einem Silicapäckchen in einem Plastikbeutel verpackt.

3.2.5 Diagnostik vor Ort

Zusätzlich zur Diagnostik der örtlichen Gesundheitseinrichtung wurde bei jedem Patienten ein Malaria-Schnelltest der Firma SD BIOLINE durchgeführt. Außerdem wurden die Patienten mit dem Dengue NS1-Schnelltest von Panbio® getestet.

3.2.6 Nukleinsäure-Extraktion der Plasmaproben in Kolumbien

Die Nukleinsäure-Extraktion der Plasmaproben erfolgte mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit von Roche anhand des von der Firma mitgelieferten Protokolls. In die im Kit enthaltenen Mikroschraubröhren wurden jeweils 200µl des mit der RNA-Konservierungslösung versetzten Plasmas pipettiert. Dann wurde die Arbeitslösung angesetzt, indem Binding Buffer mit Poly(A) im Verhältnis 50:1 versetzt wurde. Die Plasmaproben wurden mit der Arbeitslösung vermischt, anschließend wurden je 50µl Proteinase K hinzugefügt und mittels Vortex gemischt. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei +72°C inkubiert und nach Abschluss der Inkubation mit je 100µl Binding Buffer versetzt. Anschließend wurden die Proben in ein Filter-Reservoir-System pipettiert, bei dem je ein Filter in ein Reservoir gesteckt wird. Der Filter wurde dann mit verschiedenen Waschpuffern gespült, das Stecksystem nach jeder Spülung bei 8000rpm für 1min zentrifugiert, sodass sich die Waschlösung inklusive Verunreinigungen im Reservoir sammelte. Der Filter wurde dann in ein frisches Reservoir gesteckt und mit einem weiteren Waschpuffer gespült. Der erste Waschgang erfolgte mit 500µl Inhibitor Removal Buffer, der zweite und dritte mit jeweils 450µl Wash Buffer. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit 50µl Elution Buffer aus dem Filter eluiert. Das Eluat wurde in einem Schraubröhrchen bei -20°C gelagert.

3.2.7 Analyse mit der Multiplex-RT-PCR-ELISA-Methode

Die Etablierung dieser neunvalenten Multiplex-RT-PCR-ELISA für Erreger akuter Fiebersyndrome ist seit mehreren Jahren ein Projekt der AG Gehring der Universitätsmedizin Mainz. Sie beruht auf der bereits von Gröndahl, Puppe et al. (Gröndahl et al., 1999, Puppe et al., 2013) etablierten Multiplex-RT-PCR-ELISA-Methode zur Detektion von respiratorischen Erregern.

Ziel der m-RT-PCR-ELISA ist einerseits die Einteilung in Malaria-Infektion und nicht Malaria-Infektion, weshalb eine Komponente der m-RT-PCR-ELISA der Malarianachweis ist. Andererseits soll es möglich sein, die nicht-Malaria-Infektionen weiter zu untersuchen, weshalb dem Panel schrittweise verschiedene arbovirale Erreger fieberhafter Erkrankungen hinzugefügt wurden.

Die ersten arboviralen Erreger Dengue-Virus, Chikungunya-Virus und West-Nile-Virus wurden 2016 von J. Klüber in das Panel integriert (Klüber, 2016). T.W. Daniel erweiterte das Panel in seiner Arbeit 2016 um das Gelbfieber-Virus, Zika-Virus und Rift-Valley-Fever-Virus (Daniel, 2019a). C. Medina Montaña fügte schließlich noch das O'nyong-nyong-Virus und das Semliki-Forest-Virus hinzu (Medina-Montaña, 2017). In Tabelle 11 sind die für die m-RT-PCR-ELISA benutzten Positivkontrollen aufgeführt. Tabelle 12 zeigt die verwendeten Primer und Sonden.

3.2.7.1 Positivkontrollen und Primer

Tabelle 11: Verwendete Positivkontrollen

Positivkontrollen für die m-RT-PCR und Einzelprimer Dengue PCR		
<i>Erreger</i>	<i>Bezogen von</i>	<i>Art der Probe</i>
Dengue-Virus (DENV)	Bestand Labor pädiatrische Immunologie Mainz	Inaktivierter Zellkulturüberstand (Vero-Zell-Lysat)
West-Nil-Virus (WNV)	Sera Care Life Sciences	Inaktivierter Zellkulturüberstand WNV Lineage I #0410-0002
	Robert Koch Institut, Berlin	Inaktivierter Zellkulturüberstand Lineage Kunjin / New York
Zika-Virus (ZIKV)	Robert Koch Institut, Berlin	Inaktivierter Zellkulturüberstand (Lineage MR766, Vero-Zell-Lysat)
Gelbfieber-Virus (YFV)	Robert Koch Institut, Berlin	Inaktivierter Zellkulturüberstand
Semliki-Forest-Virus (SFV)	European Virus Archive goes Global (EVAg)	Mithilfe des 'QIAamp Viral RNA Mini Kit Qiagen' präparierte RNA aus Zellkulturüberstand
O'nyong-nyong-Virus (ONNV)	European Virus Archive goes Global (EVAg)	inaktivierter Zellkulturüberstand aus Vero-Zell-Lysat, Lineage Dakar 234
Chikungunya-Virus (CHIKV)	Institut for Virology-Universitätsklinikum Freiburg	gefriergetrocknete PCR- Probe, Lineage G10845
Rift-Valley-Virus (RVFV)	Robert Koch Institut, Berlin	Inaktivierter Zellkulturüberstand
Plasmodium falciparum	Discovery Life Sciences	Vollblut oder Serum von Malariapatienten,
Plasmodium vivax	P.fal DLS16-11865 VB	mikroskopisch überprüfte Proben mit hoher
Plasmodium malariae	P.viv DLS15-08486 Serum P.mal DLS15-08488 Serum	Erregerlast

Nach (Daniel, 2019a)

Tabelle 12: Verwendete Primer und Sonden

Oligonukleotide / Primerpaare 5'→3'			Fragment-länge	nach
PROTOZOEN	Plasmodium spp. MAL-Pan (PLU3)	Forw.: GCTCTTTCTTGATTTCTTGGATG Rev.: AGCAGGTTAAGATCTCGTTCCG	100 bp	(Alemayehu et al., 2013)
		Sonde: ATGCCCGTTTTAGTTCGTG		
	P.falciparum P.FAL	Forw.: CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA Rev.: TATTCCATGCTGTAGTATTCAAACACAA	100bp	(Perandin et al., 2004)
		Sonde: TGTTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGTTCA		
	P.vivax P.VIV	Forw.: ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT Rev.: ATTTACTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAGC	141bp	(Perandin et al., 2004)
		Sonde: TTCGTATCGACTTTGTGCGCATTTTGC		
	P.malariae P.MAL	Forw.: AGTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA Rev.: CAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA	166 bp	(Veron et al., 2009)
		Sonde: ATGAGTGTTTCTTTAGATAGC		

ARBOVIREN	Flaviviren	Dengue-Virus	DENV-Pan	Forw.: TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG (D1): Rev.: TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC (D2):	511 bp	(Chien et al., 2006)
				Sonde: Mix aus DENV1-4		
			DENV1	Forw.: TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG (D1): Rev.: (TS1): CCCGTAACACTTTGATCGCT	208 bp	
				Sonde: CCCGTAACACTTTGATCGCT		
			DENV2	Forw.: TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG (D1): Rev.: (TS2): CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT	119 bp	
		Sonde: CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT				
		DENV3	Forw.: TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG (D1): Rev.: (TS3): TAACATCATCATGAGACAGAGC	288 bp		
			Sonde: TAACATCATCATGAGACAGAGC			
DENV4	Forw.: TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG (D1): Rev.: (TS4): TTCTCCCGTTCAGGATGTTC	260 bp				
	Sonde: TTCTCCCGTTCAGGATGTTC					
	West-Nil-Virus	WNV	Forw.: CAGACCACGCTACGGCG Rev.: CTAGGGCCGCGTGGG	116 bp		

			Sonde: TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT	(Kauffman et al., 2003)
	Zika-Virus	ZIKV	Forw.: CAGCTGGCATCATGAAGAAYC Rev.1: CACTTGTCCCATCTTCTTCTCC Rev.2: CACCTGTCCCATCTTTTTCTCC	100 bp (Waggoner et al., 2016a)
			Sonde: CYGTTGTGGATGGAATAGTGG	
	Gelbfieber-Virus	YFV	Forw.: GCACGGATGTAACAGACTGAAGA Rev.: CCAGGCCGAACCTGTCAT	83 bp (Fernandes-Monteiro et al., 2015)
			Sonde: CGACTGTGTGGTCCGGCCCTC	
Alphaviren	Semliki-Forest-Virus	SFV	Forw.: ACAGACTGTCACTGAGCAG Rev.: GTGACCATCTACTGCAGAGA	145 bp (Puglia et al., 2013)
			Sonde: GTGACCATCTACTGCAGAGA	
	O'Nyong-g-nyong-Virus	ONNV	Forw.: GCAGGGAGGCCAGGACAGT Rev.: GCCCCTTTTTCYTTGAGCCAGTA	148 bp (Liu et al., 2016)
			Sonde: TGTATTGCTCCTGCCGCTGG	
	Chikungunya-Virus	CHIKV	Forw.: TGATCCCGACTCAACCATCCT Rev.: GGCAAACGCAGTGGTACTTCCT	81 bp (Panning et al., 2008)
			Sonde: TCCGACATCATCCTCCTTGCTGGC	
Bunyaviren	Rift-Valley-Fieber-Virus	RVFV	Forw.: TGAAAATTCCTGAGACACATGG Rev.: ACTTCCTTGCATCATCTGATG	69 bp (Liu et al., 2016)
			Sonde: CACAAGTCCACACAGGCCCTTACAT	

Nach (Daniel, 2019a)

3.2.7.2 Reverse Transkription der eluierten Proben

Vor der m-PCR wurden eine reverse Transkription durchgeführt. Die dafür nötigen Reagenzien sind in der nachfolgenden Tabelle abgebildet. Als Negativkontrolle wurde einmal statt 4,5µl Probe, 4,5µl H₂O hinzugefügt. Eine andere Negativkontrolle diente der H₂O-Kontrolle der PCR. Dieser wurden nur 15µl H₂O hinzugefügt.

Tabelle 13: Master-Mix und Protokoll für die RT

Reverse Transkription		
Master-Mix: Reagenzien pro Tube		Thermocycler-Protokoll
dNTP (je 10mM)	4,5µl	25°C für 10min 42°C für 50min 90°C für 5min 20°C → ∞
5x RT Puffer	3µl	
0,1M DTT	1,5µl	
Hexanukleotid-Primer	0,75µl	
RNasin	0,375µl	
SS Reverse Transkriptase II	0,375µl	
Probe / Kontrolle	4,5µl	
→ Gesamt	15µl	

Nach (Gröndahl et al., 1999, Puppe et al., 2013)

3.2.7.3 Multiplex-PCR

Für die Multiplex-PCR wurde der in der nachfolgenden Tabelle beschriebene Mastermix erstellt, das RT-Produkt hinzugefügt und nach dem ebenfalls Tabelle 14 zu entnehmenden Thermocycler-Protokoll amplifiziert. Zur Detektion von Malaria wurden Primer verwendet, die alle humanpathogenen Plasmodienspezies nachweisen können (MAL-Pan). Für Dengue wurden Primer verwendet, die alle 4 humanpathogenen Dengue-Serotypen nachweisen können (DENV-Pan) (siehe Tabelle 12).

Tabelle 14: Mastermix und Protokoll für die m-PCR

Multiplex-PCR		
Master-Mix: Reagenzien pro Tube		Thermocycler-Protokoll
DEPC H ₂ O	15,5µl	35 Zyklen: 94°C für 30s (5min in ersten Zyklus) 55°C für 20s 72°C für 40s (10min in letztem Zyklus) 4°C → ∞
10x Puffer	2,7µl	
AccuPrime Taq-Polymerase	0,5µl	
Primer-Mix (je 5,5pmol/µl)	1,1µl	
Digoxigenin 11-dUTP	0,3µl	
RT-Produkt	15µl	
→ Gesamt	35µl	

Nach (Gröndahl et al., 1999, Puppe et al., 2013)

3.2.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die m-PCR wurden die Amplifikate durch Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Für das dafür benötigte Gel wurden 2 Gramm Agarose unter konstanter Hitzeführung in 100 Millilitern 0,5%iger TRIS-Borat-EDTA-Puffer (im Folgenden TBE) aufgelöst. Sobald sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte, wurden 40µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegossen, der mit einem Kamm ausgestattet war. Sobald das Gel erkaltete und somit hart wurde, konnte der Kamm entfernt werden. Dadurch entstanden Taschen, in die die Proben hinein pipettiert werden konnten. 10µl Probe wurden auf einem Parafilmstreifen mit 1µl „DNA-Loading-Dye“ vermischt. Das Gemisch wurde dann in die Taschen pipettiert.

Anschließend wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. eingelassen. Es wurde 30 Minuten lang eine Spannung von 130V angelegt, um die DNA-Amplifikate ihrer Größe nach aufzutrennen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Banden mithilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

3.2.7.5 PCR-ELISA

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte und zur Erhöhung der Sensitivität wurde im Anschluss an die PCR-Amplifikation ein PCR-ELISA durchgeführt. Dafür war zuvor in der PCR Digoxigenin 11-dUTP in die DNA eingebaut worden, um die Amplifikate im PCR-ELISA mittels Antikörperreaktion nachweisen zu können (siehe Tabelle 14). Die für den ELISA benutzten Sonden finden sich in Tabelle 12.

Für den PCR-ELISA wurden eine Streptavidin-beschichtete Platte mit 96 Vertiefungen und biotinylierte Sonden benutzt.

Zuerst wurden die PCR-Produkte mit 150µl Denaturierungslösung versetzt und 10 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Hybridisierungslösungen vorbereitet. Dazu wurden 9 Plastikröhrchen à 5ml für jeweils einen der 9 verschiedenen Erreger markiert. In jedes der Röhrchen wurden nun 3ml Hybridisierungspuffer und 3µl der biotinylierten Sonde für den jeweiligen Erreger pipettiert. Dann wurden jeweils 200µl des entstandenen Gemischs in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert und anschließend mit je 15µl der denaturierten PCR-Produkte vermischt.

Als Kontrollen dienten die Negativ- und Positivkontrollen der PCR sowie als weitere Negativkontrolle ein Mix aus allen 9 Sonden/Hybridisierungspuffer-Lösungen.

Die Platte wurde mit einem Plastikfilm abgedichtet und auf einer Rüttelplatte 90min lang bei 37°C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden folgende Reagenzien zubereitet:

- Lösung aus 25ml Konjugatpuffer und 5µl Anti-Digoxigenin-Peroxidase (Verhältnis 1:5000)
- ABTS-Lösung als Substrat der Peroxidase, hergestellt aus 45ml Wasser, 5ml ABTS-Puffer und einer ABTS-Tablette der Firma Roche Diagnostics

Nach Ablauf der Inkubation wurde die Plastikabdeckung entfernt, die Platte mit dem Tecan-Washer® gewaschen und die restliche Flüssigkeit über Papier ausgeklopft. Dann wurden je 200µl des Antikörper-Puffer-Gemischs in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde erneut mit Plastik versiegelt und für 45min bei 37°C inkubiert.

Nach abgelaufenen 45min wurde die Platte wieder mit dem Tecan-Washer® gereinigt und restliche Flüssigkeit ausgeklopft. Nun wurden alle Vertiefungen mit 200µl ABTS-Lösung befüllt, die Platte ein letztes Mal versiegelt und für 10min bei 37°C inkubiert.

Im ganzen Prozess wurde immer eine Vertiefung ausgespart, die nur im letzten Schritt mit ABTS-Lösung befüllt wurde und dem Tecan-Messgerät als Leerwert diente. Die Software des Tecan-Readers® berechnete auf Basis dieses Leerwerts die optische Dichte (OD) der Flüssigkeit in den Vertiefungen. Als positiv waren Werte $> 0,4$ OD, als negativ Werte $< 0,2$ definiert. Für Werte zwischen 0,2 und 0,4 wurde eine Nachtestung empfohlen (Daniel, 2019b). Im Falle negativer Positivkontrollen oder positiver Negativkontrollen wurde der Versuch als nicht verwertbar angesehen und musste wiederholt werden.

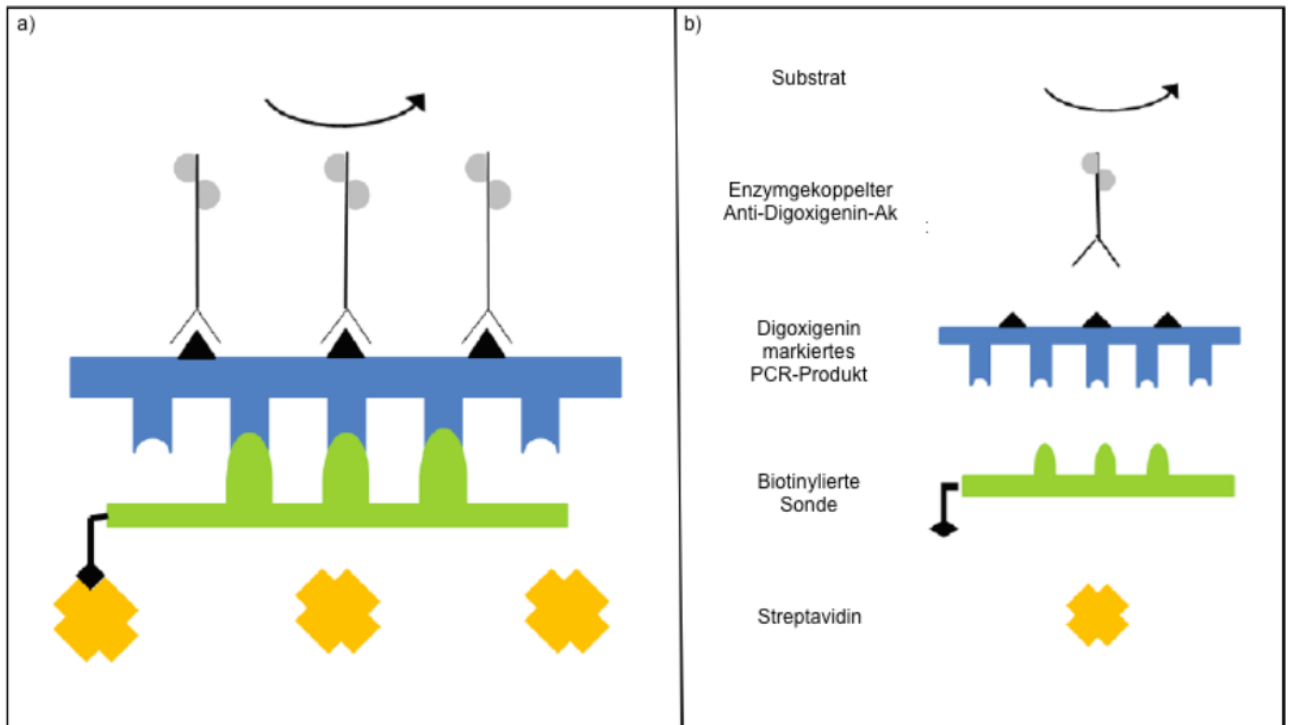


Abb.9: Schema Funktionsweise PCR-ELISA, modifiziert von (Eckert, 2019) nach (Musiani et al., 2007)

3.2.8 Einzelprimer-RT-PCR-ELISA Dengue Serotypen

Proben, die entweder im Schnelltest oder der m-RT-PCR-ELISA Dengue-positiv waren, wurden mit der Einzelprimer-RT-PCR-ELISA untersucht, um die verschiedenen Dengue-Serotypen zu bestimmen. Dafür wurde zuerst eine RT der betreffenden Proben nach dem Protokoll in Tabelle 15 gemacht. Anschließend wurde ein Mastermix für die EP-Dengue-Serotypen-PCR angesetzt. Dieser wurde dann auf vier sterile 1,5ml Sarstedt-Röhrchen aufgeteilt, je eines für einen der 4 verschiedenen Dengue-Serotypen. In die 4 Mixgefäße wurde nun nach Protokoll (Tabelle 15) Primerlösung pipettiert, pro Gefäß nur die Primer für einen Dengue-Serotypen. Die verwendeten Primer lassen sich Tabelle 12 entnehmen. Jede Probe wurde vierfach getestet, jeweils eine PCR-Tube für einen Serotypen. Die verwendeten Positivkontrollen sind in Tabelle 11 beschrieben. Als Negativkontrollen wurden alle 4 Serotypen-Mixe ohne Probe getestet. Stattdessen wurden 1,5µl H₂O hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte wie bei der m-RT-PCR mithilfe eines Agarose-Gels. Analog zur m-RT-PCR-ELISA wurde im Anschluss an die EP-Dengue-Serotypen-PCR ein ELISA nach bereits geschildertem Prozedere durchgeführt.

Tabelle 15: Mastermixe und Protokolle der Einzelprimer-RT-PCR

Reverse Transkription		
Master-Mix: Reagenzien pro Tube		Thermocycler-Protokoll
dNTP (je 10mM)	1,5µl	25°C für 10min 42°C für 50min 90°C für 5min 20°C → ∞
5x RT Puffer	1µl	
0,1M DTT	0,5µl	
Hexanukleotid-Primer	0,25µl	
RNasin	0,125µl	
SS Reverse Transkriptase II	0,125µl	
Probe / Kontrolle	1,5µl	
→ Gesamt	5µl	
Einzelprimer-PCR		
Master-Mix: Reagenzien pro Tube		Thermocycler-Protokoll
DEPC H ₂ O	11,6µl	43 Zyklen: 94°C für 30s (5min in ersten Zyklus) 55°C für 20s 72°C für 40s (10min in letztem Zyklus) 4°C → ∞
10x Puffer	2µl	
AccuPrime Taq-Polymerase	0,4µl	
Primer (Forw. + Rev. je 5,5pmol/µl)	0,8µl	
Digoxigenin 11-dUTP	0,2µl	
RT-Produkt	5µl	
→ Gesamt	20µl	

Nach (Gröndahl et al., 1999, Puppe et al., 2013)

3.2.9 EP-RT-PCR-ELISA Malaria Spezies

Nach dem Protokoll aus Tabelle 15 wurden zur Bestimmung der Plasmodienspezies Einzelprimer-PCR-ELISAs durchgeführt. Dafür wurden die in Tabelle 12 beschriebenen Primer verwendet.

3.2.10 Filterkarten: Dengue-positive Proben

Zur Klärung der Frage, ob die Whatman 903 Protein Saver Cards virale Nukleinsäuren ausreichend konservieren können, wurden die Filterkarten der Dengue-positiven Patienten zuerst eluiert und dann mit der m-RT-PCR-ELISA ausgewertet. Zur Eluierung wurde das von J. Klüber im Rahmen ihrer Masterarbeit entwickelte Protokoll verwendet (Abb.10) (Klüber, 2016).

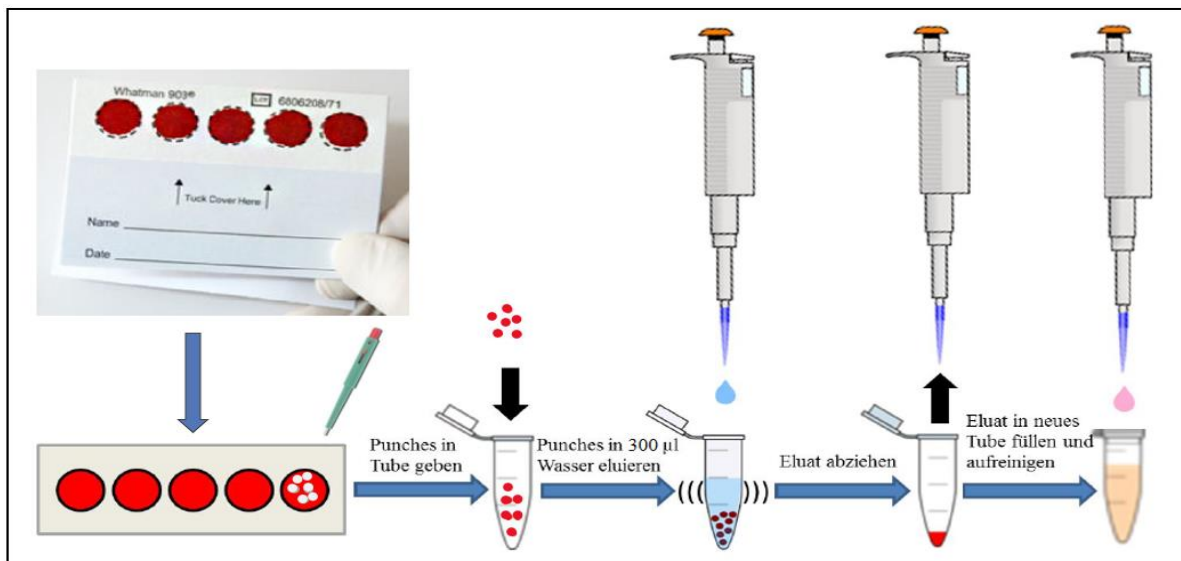


Abb.10: Eluierung des Vollblutes aus den Filterkarten, Grafik und Methode nach: (Klüber, 2016), modifiziert von (Daniel, 2019a)

Zuerst wurden mit Hilfe einer Stanze pro Patient sechs 3mm große Kreise (im Folgenden „Punches“ genannt) aus einem der getrockneten Blutflecken ausgestanzt. Die Punches wurden anschließend in ein steriles 1,5ml Reaktionsröhrchen gegeben und in 300µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Dann wurden die Tubes in einen Thermomixer gestellt und eine Stunde bei 60°C und 750rpm inkubiert. Die Proben wurden dabei alle 15min kurz aus dem Thermomixer genommen und gevortext. Nach einer Stunde Inkubation wurde alle Flüssigkeit abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Zur Verbesserung des Ergebnisses wurden die Punches noch eine Minute bei 8000rpm zentrifugiert. Die dabei entwichene Flüssigkeit wurde ebenfalls in das neue Röhrchen pipettiert. Das Eluat wurde nun bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Bei der späteren Nukleinsäureextraktion wurde erneut das High Pure Viral Nucleic Acid Kit von Roche nach bereits beschriebenem Protokoll verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Das Patientenkollektiv

4.1.1 Soziodemographische Daten

Insgesamt wurden 127 Patienten in die Studie aufgenommen, davon 75 aus dem Chocó und 52 aus Urabá (19 aus Apartadó und 33 aus Turbo). Es wurde kein Patient nachträglich aus der Erhebung ausgeschlossen.

In Tabelle 16 findet sich eine Übersicht über das Patientenkollektiv.

Tabelle 16: Das Patientenkollektiv

Patienten gesamt	Männer	Frauen	Patienten >15 Jahre	Patienten <15 Jahre	Alter in Jahren Ø
127	58	69	76	51	~26,75 2 – 77Jahre (SD~ 20,17)

Abbildung 11 zeigt die Berufsgruppen der Probanden, aufgeschlüsselt nach ihrer Häufigkeit. Insgesamt wurden bei 85 Patienten Berufe oder eine Beschäftigung erfasst. Die größte Gruppe bildeten Schüler und Studenten mit 34 Vertretern. Anschließend folgten Minenarbeiter (13 Patienten), Hausfrauen (12 Patienten) und Bauarbeiter (11 Patienten).

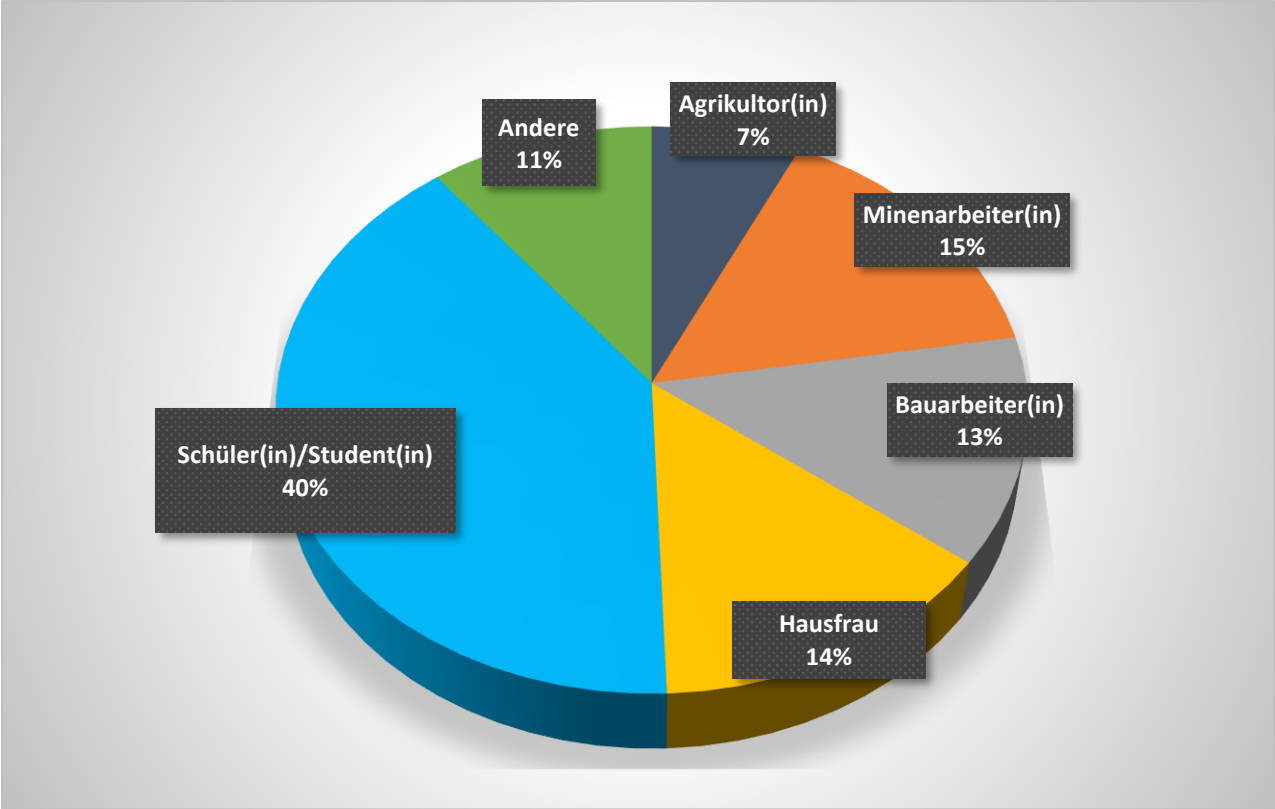


Abb.11: Berufsgruppen der Probanden

4.1.2 Vitalparameter

Tabelle 17 zeigt die durchschnittliche Temperatur, Sauerstoffsättigung, Blutdruck sowie Herz- und Atemfrequenz bei Untersuchung. Wie bereits im Methodenteil geschildert, konnte nicht jeder Endpunkt bei jedem Patienten bestimmt werden. Zur besseren Übersicht sind die Parameter mit n (Anzahl der Befragten) gekennzeichnet.

Tabelle 17: Vitalparameter

	Axilläre Temperatur in °C	S_pO₂ in %	Herzfrequenz (1/s)	Atemfrequenz (1/s)	Blutdruck systolisch in mmHg	Blutdruck diastolisch in mmHg
Mittelwert	~37,17	~97,41	~94,2	~20,32	~121,4	~78,88
Minimum-Maximum	35,1 - 40,2	92 -100	54 – 153	12 – 45	91-160	50-120
Standardabweichung	~1,08	~1,41	~24,37	~5,83	~12,42	~13,02
Anzahl der Befragten (n)	124	122	122	115	72	72

4.1.3 Krankengeschichte der Probanden

4.1.3.1 Voroperationen

28 Patienten waren bereits mindestens einmal operiert worden. Die größte Gruppe bildeten die gynäkologischen Voroperationen (10 Patientinnen). 7 Patientinnen hatten eine oder mehrere Kaiserschnitt-Operationen. 6 Patienten waren orthopädisch voroperiert und 4 Patienten hatten eine Appendektomie erhalten.

4.1.3.2 Infektionserkrankungen

4.1.3.2.1 Malaria

46 Patienten gaben an, bereits mindestens einmal an Malaria erkrankt gewesen zu sein. Die Anzahl an vorausgegangenen Malariainfektionen variierte dabei. Der Mittelwert der Anzahl angegebener Vorinfektionen mit Malaria lag bei ~3,31 mit einer Standardabweichung von ~2,76. Die Anzahl der Vorinfektionen reichte von 1 bis 12 Vorinfektionen.

4.1.3.2.2 Dengue

Zwei Patienten gaben an, jeweils einmal vorher am Dengue-Fieber erkrankt gewesen zu sein.

4.1.3.2.3 Zika

Ein Patient gab an, 2016 mit dem Zika-Virus infiziert gewesen zu sein.

4.1.3.3 Weitere Vorerkrankungen

Tabelle 18 zeigt die häufigsten sonstigen Vorerkrankungen.

Tabelle 18: Weitere Vorerkrankungen

Erkrankung	Anzahl
arterielle Hypertonie	9
Asthma bronchiale	4
Diabetes mellitus	4
Malignome in der Vorgeschichte	2
Schilddrüsenerkrankungen	2

4.1.4 Häufigste Symptome zum Untersuchungszeitpunkt

Abbildung 12 zeigt die häufigsten Symptome der 127 Patienten zum Untersuchungszeitpunkt. Besonders häufig waren Kopfschmerzen, Schüttelfrost und Schwitzen.

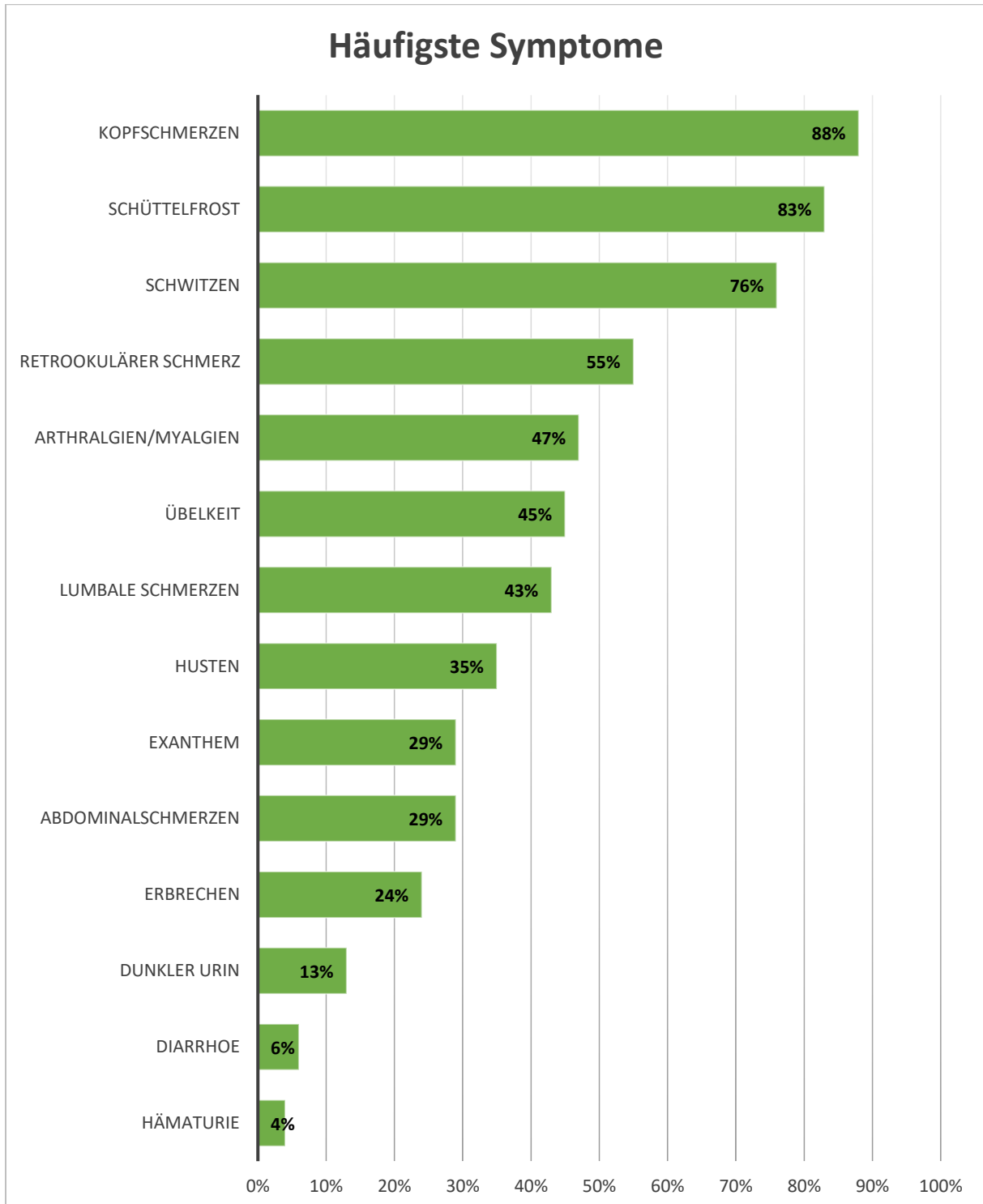


Abb.12: Häufigste Symptome

4.1.5 Detektierte Infektionen

4.1.5.1 Schnelltests

Insgesamt waren 15 Probanden Schnelltest-positiv für das NS1-Antigen des Dengue-Virus. 15 Patienten hatten einen positiven Malaria-Schnelltest, davon 7 Patienten für *P.falciparum* und 8 für *P.vivax*.

4.1.5.2 RT-PCR-ELISA

Tabelle 19 zeigt die Aufschlüsselung der mit der m-RT-PCR-ELISA und EP-RT-PCR-ELISA detektierten Erkrankungen. Außer Malaria und Dengue wurde kein weiterer der insgesamt 9 detektierbaren Erreger gefunden.

Tabelle 19: Detektierte Erkrankungen

	Chocó	Urabá	Gesamt
Patienten	75	52	127
Dengue	6	9	15
Malaria gesamt	11	6	17

4.1.5.2.1 Malaria in der m-RT-PCR-ELISA

Alle Malaria-Schnelltest-positiven Proben konnten mittels m-RT-PCR-ELISA bestätigt werden. Darüber hinaus wurden mittels m-RT-PCR-ELISA zwei weitere Malaria-positive Proben detektiert. Daraus ergibt sich eine Gesamtzahl von 17 Patienten mit Malariainfektion. Eine weitere Bestimmung dieser Proben mittels Einzelprimer-PCR-ELISA ergab, dass die Schnelltests in den 15 Fällen jeweils die korrekte Infektion detektiert hatten. 7 Patienten waren in der EP-RT-PCR-ELISA positiv für *P.falciparum* und 8 für *P.vivax*. Die beiden m-RT-PCR-ELISA-positiven Proben, die in den

Schnelltests nicht positiv waren, lieferten in der EP-RT-PCR-ELISA kein Ergebnis, sodass die Spezies nicht bestimmt werden konnte.

4.1.5.2.2 Dengue in der m-RT-PCR-ELISA

15 Proben waren positiv für das NS1-Antigen im Dengue-Schnelltest. Von diesen 15 positiven konnten 12 eindeutig und beim ersten Durchlauf mittels m-RT-PCR-ELISA nachgewiesen werden. Dabei galten Proben als DENV-positiv, wenn sich im Gel eine Bande mit definierter Fragmentlänge darstellte und gleichzeitig im PCR-ELISA ein positives Signal nachgewiesen wurde. Die Fragmentlänge richtete sich nach der Größe des Fragments der DENV-Positivkontrollen.

In Probe Nummer 009 konnte bei mehrmaliger Testung weder im Agarose-Gel noch im PCR-ELISA DENV nachgewiesen werden. Probe Nummer 091 war nicht eindeutig positiv für Dengue. Die m-RT-PCR ergab ein schwach positives Signal im Gel, war jedoch im PCR-ELISA negativ. Bei einer späteren Wiederholung war im Gel keine Bande für 091 zu sehen, der PCR-ELISA ergab aber ein positives Ergebnis.

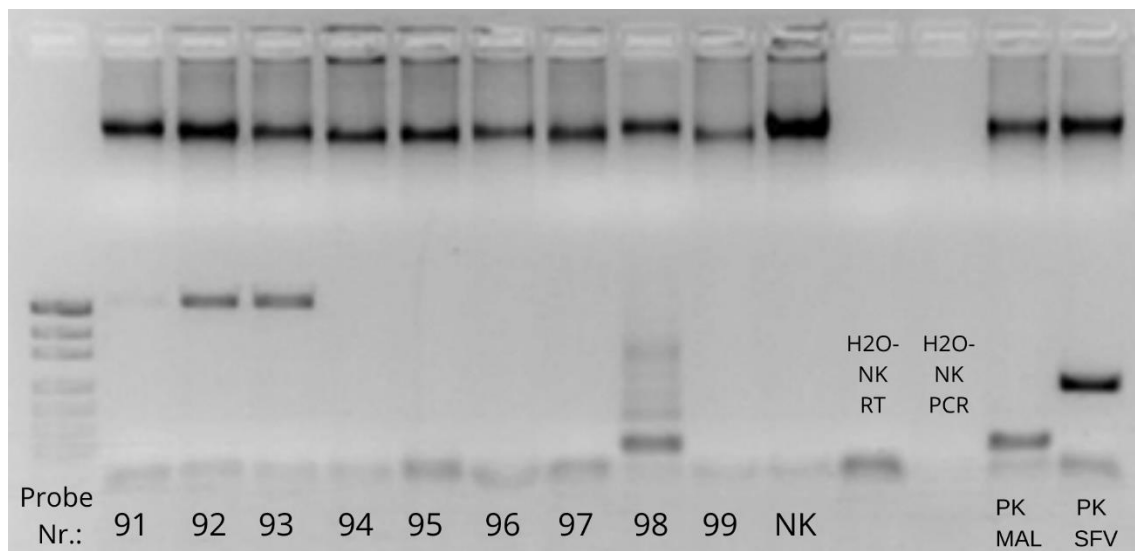


Abb.13: Probe Nummer 91 im Gel

Probe Nummer 91 im Gel, daneben Proben 92 und 93, beide mit eindeutigen Banden (NK=Negativkontrolle; PK=Positivkontrolle; MAL=Malaria; SFV=Semliki-Forest-Virus)

4.1.5.3 EP-RT-PCR-ELISA Dengue Serotypen

Alle 15 DENV-Schnelltest-positiven Proben konnten in der EP-RT-PCR-ELISA eindeutig nachgewiesen werden.

Die folgende Tabelle zeigt die gefundenen Serotypen, aufgeschlüsselt nach Orten.

Tabelle 20: Detektierte Serotypen

	Gesamt	Quibdó	Apartadó	Turbo	Urabá gesamt
DENV1- Infektion	2	2	0	0	0
DENV3- Infektion	4	0	3	1	4
Co-Infektion DENV1 & DENV4	9	4	1	4	5

4.1.5.4 m-RT-PCR-ELISA ausgehend von Filterkarten

15 DENV-Infektionen konnten durch m-RT-PCR-ELISA und EP-RT-PCR-ELISA aus Patientenplasma nachgewiesen werden. Keine dieser detektierten Infektionen konnte aus Blut nachgewiesen werden, das mittels Whatman 903 Protein Saver Cards konserviert wurde.

4.1.6 Vergleich positiv und negativ getesteter Patienten

4.1.6.1 Symptome

Abbildung 14 vergleicht Symptome bei DENV-positiven, MAL-positiven und Patienten, die auf keines der 9 Pathogene in der m-RT-PCR-ELISA positiv getestet wurden. Es lässt sich eine große Ähnlichkeit der Symptomatik zwischen den Gruppen erkennen. Ein Exanthem wurde bei Malariapatienten nicht beobachtet, bei DENV-positiven jedoch in 13% der Fälle.

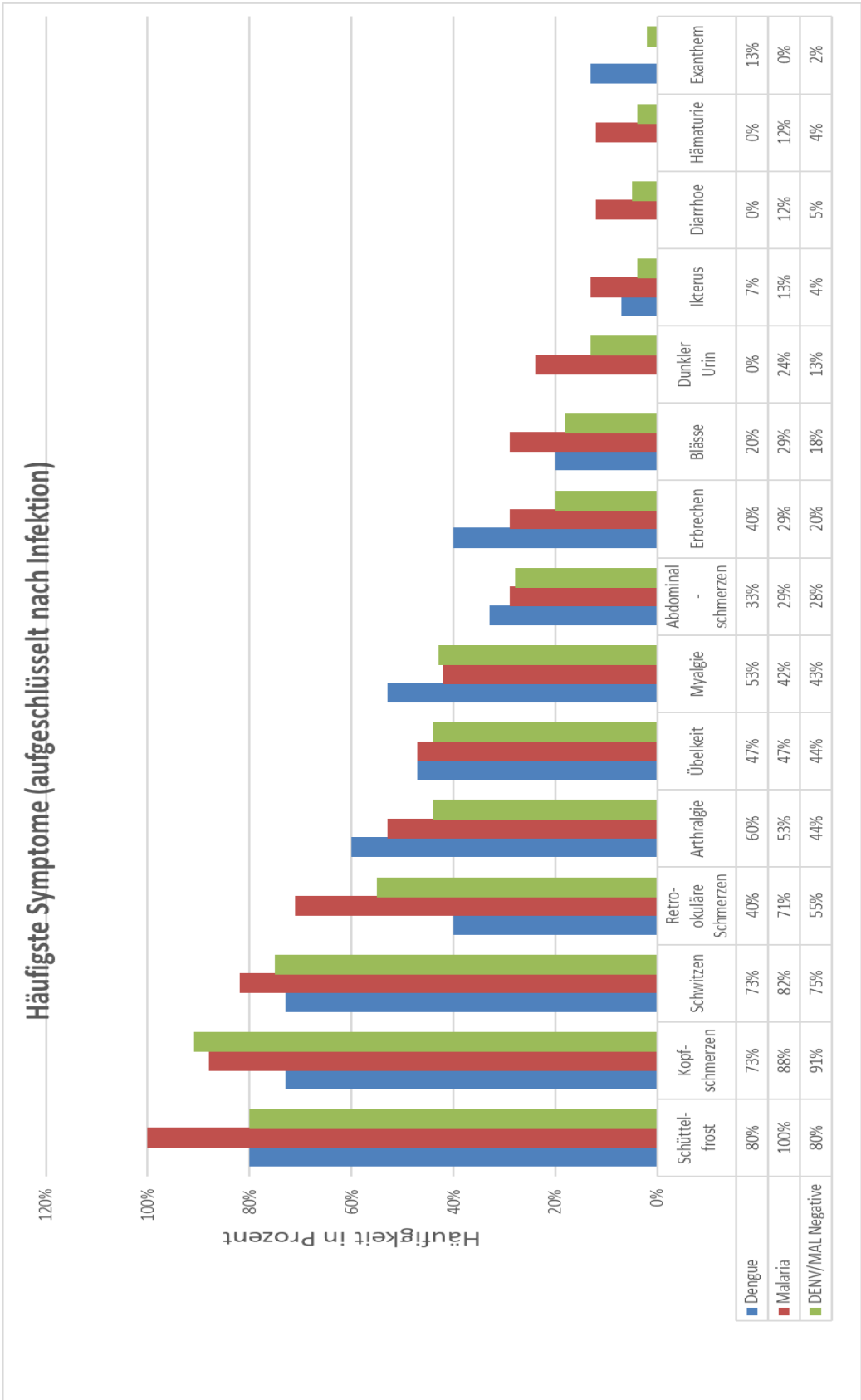


Abb.14: Häufigste Symptome aufgeschlüsselt nach Infektionen

4.1.6.2 Durchschnittlicher Hämoglobinwert

Beim durchschnittlichen Hämoglobinwert in g/dl ließen sich leichte Unterschiede zwischen den verschiedenen Infektionsgruppen feststellen. Patienten mit Malariainfektion hatten einen durchschnittlichen Hämoglobinwert von 11,9 g/dl, Patienten mit Dengue von 12,5 g/dl und Patienten ohne detektierte Infektion von 12,9 g/dl.

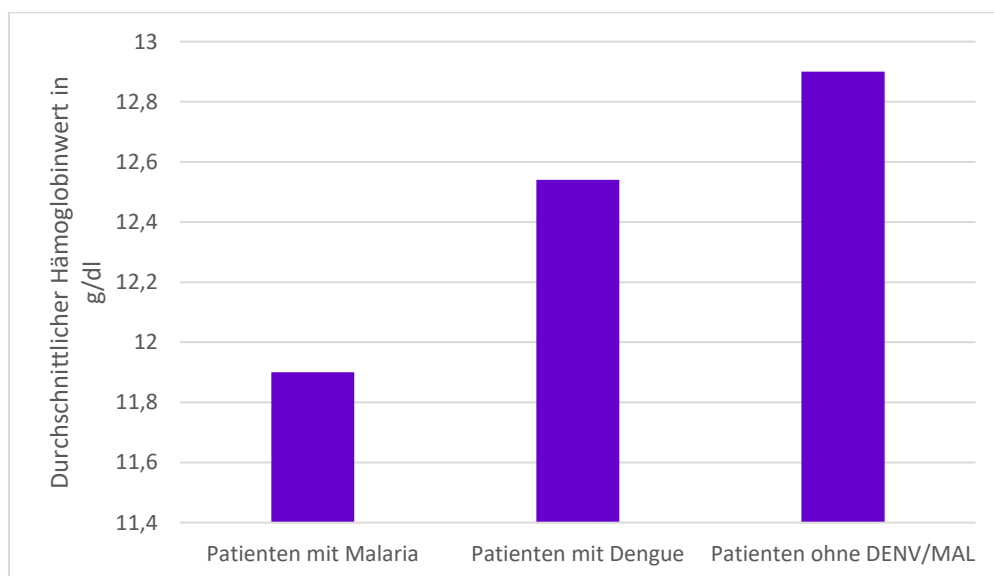


Abb.15: Durchschnittliche Hämoglobinwerte aufgeschlüsselt nach Infektion

4.1.6.3 Altersdurchschnitt

Auch beim Altersdurchschnitt ließen sich Unterschiede zwischen den Infektionsgruppen erkennen. Patienten mit DENV-Infektion waren im Schnitt 11,87, Patienten ohne detektierte Infektion 28,12 Jahre alt. Patienten mit Malaria hatten mit 32,24 Jahren das höchste Durchschnittsalter.

Abbildung 16 stellt die Mittelwerte des Alters nach Infektionen graphisch dar.

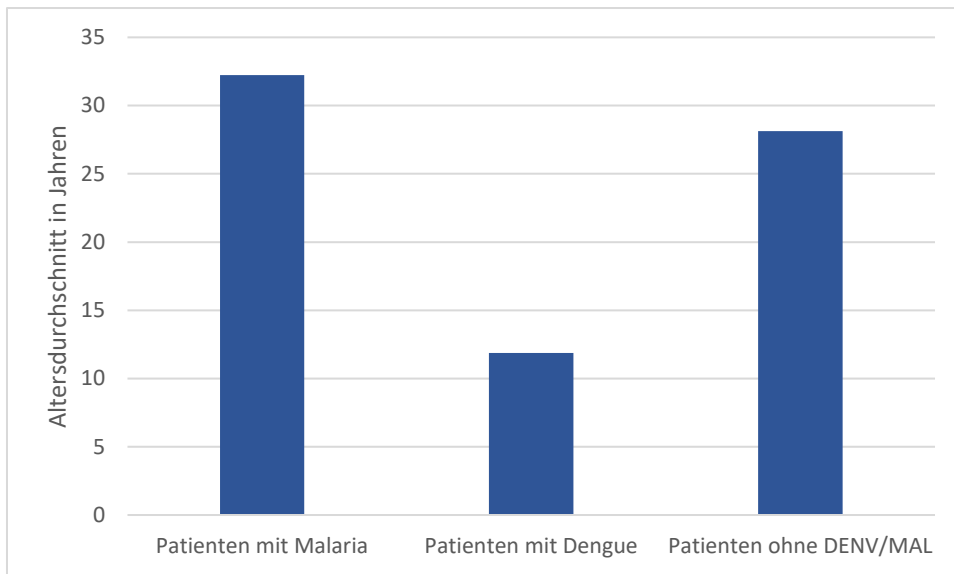


Abb.16: Mittleres Alter der Patienten aufgeschlüsselt nach Infektionen

4.1.7 Patienten mit Dengue-Warnsignalen

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Häufigkeit von Symptomen, die bei den Dengue-positiven Patienten auftraten und von der WHO als Warnsignale für einen möglichen schweren Verlauf der Dengue-Infektion beschrieben wurden (WHO, 2009). Da keine Nachbetreuung der Patienten erfolgte, kann keine Auskunft darüber gegeben werden, in welchen Fällen tatsächlich schwere Verläufe auftraten.

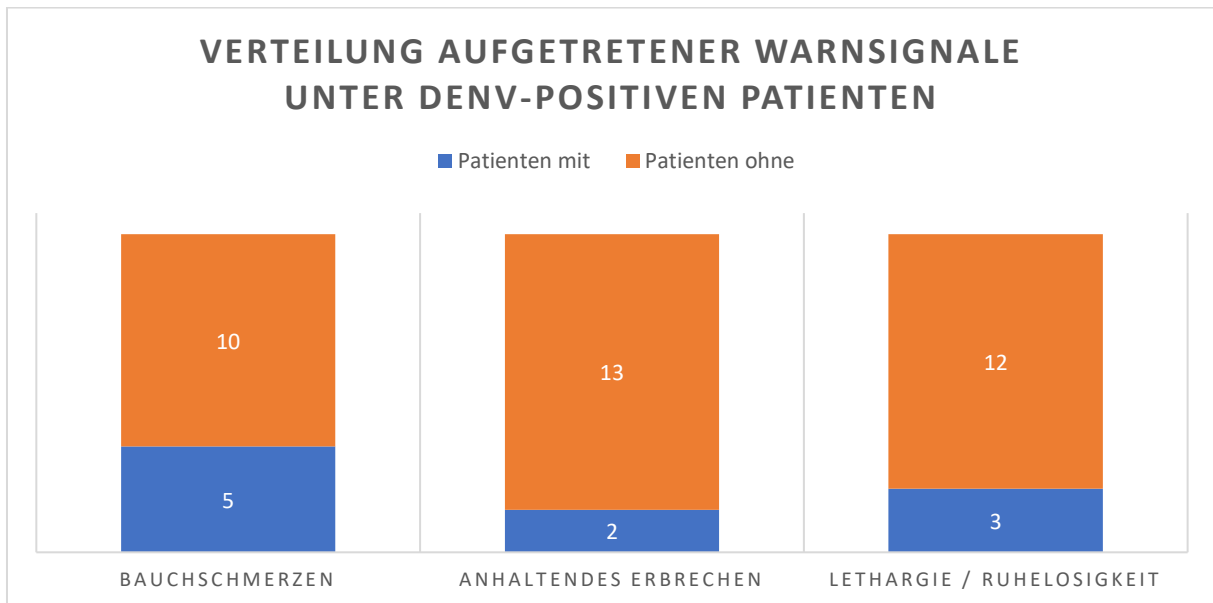


Abb.17: Verteilung aufgetretener Warnsignale unter DENV-positiven Patienten

5 Diskussion

Verschiedenste humanpathogene arbovirale Erreger haben sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten in aller Welt ausgebreitet. Sie stellen eine Bedrohung für die öffentliche Gesundheit in zahlreichen Ländern dar und haben bereits in der Vergangenheit gesundheitliche, soziale und ökonomische Krisen ausgelöst (Girard et al., 2020, Braack et al., 2018).

Infektionen mit diesen Pathogenen manifestieren sich häufig als akute fiebrige Syndrome. Dabei ist die Zahl der Differentialdiagnosen groß, sodass eine klinische Diagnose so gut wie unmöglich ist. Viele Pathogene, die eine AFI verursachen, können mit spezifischen Therapien gut behandelt werden. Dafür ist in vielen Fällen eine eindeutige Diagnose notwendig (Paixão et al., 2018, Weaver et al., 2018, Simmons et al., 2012, Chappuis et al., 2013).

Diese Konstellation unterstreicht die Bedeutung effektiver Diagnostikmöglichkeiten. Das m-RT-PCR-ELISA-Panel der AG Gehring deckt 9 verschiedene Pathogene ab, die eine unspezifische fiebrige Erkrankung verursachen können (siehe Literaturdiskussion). Die Methodik basiert dabei auf einem von B. Gröndahl et al. entwickelten Panel einer m-RT-PCR-ELISA für Erreger akuter Atemwegsinfektionen (Gröndahl et al., 1999). Diese Methode wurde in den klinischen Alltag an der Universitätsmedizin Mainz eingebracht. Seit 1996 wurden damit mehr als 30.000 Patientenproben analysiert.

Auch kommerziell entwickelte m-PCR-Panels halten Einzug in den klinischen Alltag. Ihr Ziel ist es, die Diagnostik verschiedener Erkrankungen zu beschleunigen und zu vereinfachen (Ramanan et al., 2017, Tansarli and Chapin, 2020).

Selbige Ziele verfolgt auch die in diesem Projekt benutzte m-RT-PCR-ELISA-Methode. Um im klinischen Setting Verwendung finden zu können, muss sie allerdings erst in verschiedenen Situationen getestet werden. Mit diesem Ziel wurden im Rahmen dieser Forschungsarbeit 127 Patientenproben aus Kolumbien analysiert. Die formulierten Hypothesen sollten somit der Funktionsprüfung der m-RT-PCR-ELISA-Methode dienen.

Es ist bekannt und dokumentiert, dass verschiedene arbovirale Erreger seit mehreren Jahren in Kolumbien zirkulieren (Martínez-Bello et al., 2019, INS, 2019, INS, 2020, López-Montenegro et al., 2019, Villar et al., 2015). Im Vorfeld des Projektes war allerdings unklar, ob einer oder mehrere dieser Erreger zum Untersuchungszeitpunkt an einem der Studienorte nachzuweisen sein würde.

Die Hypothese, dass arbovirale Erreger zum Untersuchungszeitraum an den designierten Studienorten zirkulierten, konnte teilweise bestätigt werden, da ein Arbovirus, nämlich DENV, nachgewiesen wurde. Alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten wurden mit NS1-Dengue-Schnelltests untersucht. 15 Patienten hatten ein positives Schnelltest-Ergebnis. Alle 15 dieser Patienten konnten im Anschluss im Labor in Mainz als positiv bestätigt werden. Darüber hinaus wurden keine weiteren Dengue-Infektionen nachgewiesen. Die Nachweise wurden durch die m-RT-PCR-ELISA und die EP-RT-PCR-ELISA für Dengue-Serotypen geführt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Dengue-NS1-Schnelltests eine wichtige Rolle in der frühzeitigen Diagnostik von Dengue-Infektionen spielen können. Allerdings ist zu beachten, dass, je nach Hersteller, Studie und Stadium der Erkrankung große Schwankungen der Sensitivität und Spezifität auftreten. Daraus können sich Unsicherheiten für die Diagnostik und Behandlung der Patienten ergeben, weshalb weitere Labordiagnostik sinnvoll sein kann. NS1-Schnelltests mit hoher Spezifität könnten allerdings trotz niedriger Sensitivität eingesetzt werden, um große Dengue-Ausbrüche früh zu diagnostizieren und zu bekämpfen. Des Weiteren können Dengue-Schnelltests eine wichtige Rolle in der Diagnostik und Behandlung von Menschen spielen, die in abgeschiedenen Regionen leben, in denen keine oder nur limitierte Labordiagnostik möglich ist (Shukla et al., 2017, Hunsperger et al., 2014, Gaikwad et al., 2017).

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Kombinationsschnelltests für NS1 und Dengue-spezifisches IgM/IgG bessere Ergebnisse liefern als solitäre NS1-Schnelltests (Jang et al., 2019, Shukla et al., 2017, Wang and Sekaran, 2010). In zukünftigen Projekten zur Validierung der m-RT-PCR-ELISA sowie für Gesundheitspersonal in Endemiegebieten, könnte es daher sinnvoll sein, NS1-Schnelltests durch Kombinationsschnelltests für NS1 und IgM/IgG zu ersetzen.

Wie im Ergebnisteil geschildert, konnten durch die EP-RT-PCR-ELISA solitäre Infektionen mit DENV1 und DENV3 sowie Koinfektionen mit DENV1 und DENV4 nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Zirkulation eines Arbovirus, nämlich DENV, bestätigen. Weitere arbovirale Erreger wurden nicht nachgewiesen.

Koinfektionen mit verschiedenen DENV-Serotypen treten auf, wenn verschiedene Serotypen am selben Ort zirkulieren (Senaratne et al., 2020). Diese Kozirkulation ist ein gängiges Phänomen in Lateinamerika (Ramos-Castañeda et al., 2017). Ob Koinfektionen einen Einfluss auf das klinische Outcome von Patienten haben, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantwortet werden. Verschiedene Studien zeigen diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse (Senaratne et al., 2020, Dhanoa et al., 2016). Um die Zusammenhänge zwischen Koinfektionen und der Schwere der Erkrankung besser zu verstehen, sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen von Nöten.

Die 15 DENV-Infektionen wurden als bestätigt angesehen, da sie sowohl im Schnelltest als auch in der EP-RT-PCR-ELISA positiv waren. Die m-RT-PCR-ELISA erkannte 12 von 15 DENV-Infektionen im ersten Durchlauf. Eine Probe stellte sich bei einer wiederholten Testung mit der m-RT-PCR-ELISA positiv in Gel und ELISA dar, zwei Proben konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der Zeitpunkt der Probenentnahme sein. Bei einem Entnahmezeitpunkt im fortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung könnte die Virämie bereits unter den von der m-RT-PCR-ELISA detektierbaren Wert gefallen sein. Bei Sekundärinfektionen mit DENV besteht die Möglichkeit, dass die Virämie bereits verfrüht absinkt (Muller et al., 2017, Simmons et al., 2012).

Die zweite Hypothese, dass die m-RT-PCR-ELISA arbovirale Erreger identifizieren kann, lässt sich teilweise annehmen, da mit der m-RT-PCR-ELISA beim ersten Anlauf 12 DENV-positive Patientenproben nachgewiesen werden konnten. Um eine verlässliche Aussage über die tatsächliche Sensitivität und Spezifität der Methode treffen zu können, müssten allerdings mehr Proben analysiert werden. Dabei muss auch die Funktionsfähigkeit der m-RT-PCR-ELISA hinsichtlich der bisher nicht in Patientenproben detektierten Pathogene im Panel berücksichtigt werden.

Der DENV-Nachweis konnte ausschließlich aus konserviertem Plasma der Patienten geführt werden. Aus dem auf Whatman 903 Protein Saver Cards konservierten Patientenblut konnte keine der 15 DENV-positiven Patientenproben nachgewiesen werden.

Daher ließe sich vermuten, dass Whatman 903 Protein Saver Cards keine geeignete Konservierungsmethode für den DENV-Nachweis mittels m-RT-PCR-ELISA sind. Die dritte Hypothese könnte somit in diesem Fall abgelehnt werden. Allerdings konnte in anderen Studien bereits nachgewiesen werden, dass sich DENV-RNA aus Blut nachweisen lässt, das auf Filterkarten konserviert wurde (Aubry et al., 2012, Matheus et al., 2012, Matheus et al., 2007, Matheus et al., 2008, Prado et al., 2005). In zukünftigen Projekten könnten die in diesen Studien beschriebenen Protokolle verwendet werden, um die Probenentnahme und -konservierung einfacher und effizienter zu gestalten.

Für die Whatman 903 Protein Saver Cards bestätigte sich darüber hinaus erneut, dass sie sich als Konservierungsmethode für Plasmodien eignen. Dies zeigte sich bereits in verschiedensten Studien (Jones et al., 2012, Koliopoulos et al., 2021, Zainabadi et al., 2017, Daniel, 2019a).

Aussichten und Limitationen

Ein möglicher Anwendungsbereich der m-RT-PCR-ELISA ist der klinische Alltag in von arboviralen Infektionen betroffenen Ländern. Das Panel könnte dabei wichtige Beiträge zur Identifikation oder zum Ausschluss arboviraler Infektionen leisten. Dabei könnte eine Erweiterung des Panels zur Detektion anderer Pathogene eine wichtige Rolle spielen. Als Vorbild hierfür könnte erneut die m-RT-PCR-ELISA zur Detektion respiratorischer Erreger von Gröndahl et al. dienen, deren Panel ebenfalls nachträglich erweitert wurde (Puppe et al., 2013, Gröndahl et al., 1999). Je nach Einsatzort könnte beispielsweise eine Erweiterung des Panels für Leptospiren sinnvoll sein. Eine Leptospirose kann im klinischen Verlauf einer arboviralen Infektion ähneln. Darüber hinaus ist Leptospirose eine weltweit verbreitete Krankheit, was sie zu einer wichtigen Differentialdiagnose von unspezifischem Fieber macht (Bharti et al., 2003, Simmons et al., 2012, Chappuis et al., 2013).

Besonders für Anwendungen der m-RT-PCR-ELISA in Lateinamerika könnte außerdem das Mayaro-Virus in das Panel mit aufgenommen werden. Dieses Arbovirus ist dort weit verbreitet und ähnelt in seiner klinischen Manifestation DENV, CHIKV und ZIKV. Somit stellt es eine wichtige Differentialdiagnose dieser Erreger dar (Acosta-Ampudia et al., 2018, Diagne et al., 2020). Darüber hinaus kann das Mayaro-Virus auch als Koinfektion mit DENV auftreten (Lednicky et al., 2016). Hotez und Murray beschreiben tropische Gebiete Lateinamerikas und der Karibik als Hochrisikozonen für das Entstehen einer Mayaro-Epidemie, was den Einsatz der m-RT-PCR-ELISA dort sinnvoll und notwendig machen könnte (Hotez and Murray, 2017).

Bei der Übertragung arboviraler Infektionen und Leptospirose spielt die Umgebung eine entscheidende Rolle. In Gegenden, in denen eine sichere Wasserversorgung und adäquate Müllbeseitigung nicht gewährleistet sind, können sich die Vektoren dieser Krankheiten besser vermehren. Im Fall von Arboviren sind wichtige Vektoren Stechmücken der Gattung *Aedes*, im Fall von Leptospirose häufig Nagetiere wie zum Beispiel Ratten. Eine erhöhte Vektorpräsenz ist ein wichtiger Risikofaktor für die Übertragung der beschriebenen Erkrankungen (Bharti et al., 2003, Haake and Levett, 2015, Kikuti et al., 2015, Rodrigues et al., 2018, WHO, 2009). Bevölkerungsgruppen, die stark von solchen Umständen betroffen sind, könnten besonders von einer Implementierung der m-RT-PCR-ELISA in den klinischen Alltag vor Ort profitieren. Leider sind für die korrekte Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionsverfahren geschultes Personal und teure Materialien von Nöten. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit dieser Mittel sind PCR-basierte Verfahren häufig nicht für den Einsatz in zuvor beschriebenen Gegenden geeignet (Escadafal et al., 2014, Lopez-Jimena et al., 2018). Dies stellt die vermutlich größte Limitation im Einsatz dieser m-RT-PCR-ELISA dar.

Für ressourcenschwache Umgebungen wurden bereits mehrere günstige, leicht zu bedienende molekulare Diagnostikverfahren zur Detektion arboviraler Erreger entwickelt. Sie könnten in Zukunft einen wichtigen Beitrag zur Diagnostik und somit zur adäquaten Behandlung arboviraler Infektionen liefern (Escadafal et al., 2014, Kutsuna et al., 2020, Lopez-Jimena et al., 2018, Patel et al., 2016, Silva et al., 2019).

Trotz des möglichen erhöhten Infektionsrisikos in ressourcenschwachen Regionen betreffen arbovirale Pathogene zunehmend auch industrialisierte Gesellschaften. Die Ausbreitung arboviraler Erreger hängt dabei stark von der Ausbreitung möglicher Vektoren ab. Die globale Erwärmung steht im Verdacht, ein kritischer Faktor zu sein, der die Ausbreitung von Arthropoden und denen von ihnen übertragenen Krankheitserregern begünstigt (Barzon, 2018, Gould and Higgs, 2009, Riccardo et al., 2020, Young, 2018, Tomasello and Schlagenhauf, 2013, Kraemer et al., 2019).

WNV, das am weitesten verbreitete Arbovirus der Welt, hat bereits den Süden Europas erreicht. Aber auch in Deutschland wurden kürzlich autochthone, von Stechmücken übertragene, WNV-Infektionen des Menschen beobachtet (Riccardo et al., 2020, Ziegler et al., 2020). Auch DENV und CHIKV haben Europa bereits erreicht. Zahlreiche autochthone Übertragungen auf den Menschen sind beschrieben, hauptsächlich im Süden Europas (Delisle et al., 2015, Tomasello and Schlagenhauf, 2013). *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* sind wichtige Vektoren für Arboviren, im Besonderen für CHIKV, DENV, ZIKV und YFV. Wie bereits geschildert, steht die Ausbreitung dieser Vektoren in direktem Zusammenhang mit der Ausbreitung oben genannter Viren. Beide Vektoren profitieren stark vom internationalen Reiseverkehr und dem globalisierten Handel. Zusammen mit der globalen Erwärmung werden diese Faktoren als hauptverantwortlich für die weltweite Verbreitung arboviraler Erreger angesehen. Es ist davon auszugehen, dass die erwähnten Krankheitserreger in naher Zukunft auch in Europa und Nordamerika eine relevante Rolle spielen werden (Kraemer et al., 2019, Young, 2018, Jelinek, 2009, Barzon, 2018). Im Zuge dieser Entwicklungen könnte die m-RT-PCR-ELISA einen wichtigen Beitrag zur Diagnostik relevanter arboviraler Pathogene liefern. Wie oben bereits beschrieben, ist die Voraussetzung dafür das Vorhandensein von Material und geschultem Personal. Zusätzlich muss die m-RT-PCR-ELISA mit weiteren Patientenproben validiert und mit dem diagnostischen Goldstandard hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität verglichen werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die von der AG Gehring der Universitätsmedizin Mainz entwickelte Multiplex-RT-PCR-ELISA für 8 Arboviren und Malaria an Patientenproben aus Kolumbien getestet. Insgesamt wurden dafür 127 Patienten rekrutiert, die wegen akut fiebriger Symptomatik vorstellig geworden waren.

Nach der Rekrutierung wurden die Patienten unmittelbar einem DENV- und einem Malaria-Schnelltest unterzogen. Dabei erhielten 15 Personen ein DENV-positives und 15 ein Malaria-positives Testergebnis.

Das den Patienten an den Studienorten entnommene Plasma wurde im Anschluss an die Probengewinnung konserviert und gefroren. Nach dem Versand wurde es in Mainz aufbereitet und mittels m-RT-PCR-ELISA analysiert. Zum Vergleich stand außerdem auf Filterkarten getrocknetes Vollblut, welches ebenfalls analysiert wurde. Die 15 DENV-Schnelltest-positiven Proben konnten mittels EP-RT-PCR-ELISA für DENV bestätigt werden. Mit der m-RT-PCR-ELISA konnten 12 der 15 DENV-Infektionen eindeutig nachgewiesen werden. Die anschließende Serotypisierung der DENV-positiven Proben mittels EP-RT-PCR-ELISA identifizierte 9 Koinfektionen mit DENV1 und DENV4, sowie 2 DENV1 und 4 DENV3 Infektionen.

Des Weiteren konnten die 15 Malaria-Schnelltest-Fälle mittels m-RT-PCR-ELISA bestätigt und 2 zusätzliche nachgewiesen werden.

Von den weiteren 7 Erregern des Multiplex-Panels wurde keiner nachgewiesen.

Ausgehend vom konservierten Vollblut der Filterkarten konnten alle Malaria-positiven Proben und keine der DENV-positiven Proben nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass zum Forschungszeitpunkt ein arboviraler Erreger und Malaria an den Studienorten in Kolumbien zirkulierten. Mittels m-RT-PCR-ELISA ließen sich diese Infektionen im konservierten Patientenplasma nachweisen.

Allerdings gelang es nicht, alle DENV-positiven Proben mit der für diese Arbeit zentralen Methode nachzuweisen, weshalb deren Wirksamkeit in zukünftigen Projekten verbessert und weiter erprobt werden sollte.

7 Literaturverzeichnis

- ABDAD, M. Y., SQUIRES, R. C., COGNAT, S., OXENFORD, C. J. & KONINGS, F. 2017. External quality assessment for arbovirus diagnostics in the World Health Organization Western Pacific Region, 2013-2016: improving laboratory quality over the years. *Western Pacific surveillance and response journal : WPSAR*, 8, 27-30.
- ACOSTA-AMPUDIA, Y., MONSALVE, D. M., RODRÍGUEZ, Y., PACHECO, Y., ANAYA, J. M. & RAMÍREZ-SANTANA, C. 2018. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg Microbes Infect*, 7, 163.
- ADAM, A. A., KARSANY, M. S. & ADAM, I. 2010. Manifestations of severe Rift Valley fever in Sudan. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, e179-e180.
- AL-HAZMI, M., AYOOLA, E. A., ABDURAHMAN, M., BANZAL, S., ASHRAF, J., EL-BUSHRA, A., HAZMI, A., ABDULLAH, M., ABBO, H., ELAMIN, A., AL-SAMMANI EL, T., GADOUR, M., MENON, C., HAMZA, M., RAHIM, I., HAFEZ, M., JAMBAVALIKAR, M., ARISHI, H. & AQEEL, A. 2003. Epidemic Rift Valley fever in Saudi Arabia: a clinical study of severe illness in humans. *Clin Infect Dis*, 36, 245-52.
- ALEJANDRIA, M. M. 2015. Dengue haemorrhagic fever or dengue shock syndrome in children. *BMJ Clin Evid*, 2015.
- ALEMAYEHU, S., FEGHALI, K. C., COWDEN, J., KOMISAR, J., OCKENHOUSE, C. F. & KAMAU, E. 2013. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malar J*, 12, 277.
- ALTAMIRANDA-SAAVEDRA, M., PORCASI, X., SCAVUZZO, C. M. & CORREA, M. M. 2018. Downscaling incidence risk mapping for a Colombian malaria endemic region. *Trop Med Int Health*, 23, 1101-1109.
- ARROYAVE, E., LONDONO, A. F., QUINTERO, J. C., AGUDELO-FLOREZ, P., ARBOLEDA, M., DIAZ, F. J. & RODAS, J. D. 2013. [Etiology and epidemiological characterization of non-malarial febrile syndrome in three municipalities of Uraba (Antioquia), Colombia]. *Biomedica*, 33 Suppl 1, 99-107.
- AUBRY, M., ROCHE, C., DUPONT-ROUZEYROL, M., AASKOV, J., VIALON, J., MARFEL, M., LALITA, P., ELBOURNE-DUITUTURAGA, S., CHANTEAU, S., MUSSO, D., PAVLIN, B. I., HARRISON, D., KOOL, J. L. & CAO-LORMEAU, V.-M. 2012. Use of serum and blood samples on filter paper to improve the surveillance of dengue in Pacific Island Countries. *Journal of Clinical Virology*, 55, 23-29.
- BALKHY, H. H. & MEMISH, Z. A. 2003. Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. *Int J Antimicrob Agents*, 21, 153-7.
- BARZON, L. 2018. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol*, 107, 38-47.
- BERTA NELLY RESTREPO, L. D. P., IVONY YIRETH AGUDELO, & KATHERINE MARÍN, R. R. 2015. Infección por dengue: una causa frecuente de síndrome febril en pacientes de Quibdó, Chocó, Colombia. *Revista Biomédica*.

- BESSAUD, M., PEYREFITTE, C. N., PASTORINO, B. A., GRAVIER, P., TOCK, F., BOETE, F., TOLOU, H. J. & GRANDADAM, M. 2006. O'nyong-nyong Virus, Chad. *Emerg Infect Dis*, 12, 1248-50.
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICARDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M., LOVETT, M. A., LEVETT, P. N., GILMAN, R. H., WILLIG, M. R., GOTUZZO, E. & VINETZ, J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3, 757-71.
- BOILLAT-BLANCO, N., KLAASSEN, B., MBARACK, Z., SAMAKA, J., MLAGANILE, T., MASIMBA, J., FRANCO NARVAEZ, L., MAMIN, A., GENTON, B., KAISER, L. & D'ACREMONT, V. 2018. Dengue fever in Dar es Salaam, Tanzania: clinical features and outcome in populations of black and non-black racial category. *BMC Infect Dis*, 18, 644.
- BOS, S., GADEA, G. & DESPRES, P. 2018. Dengue: a growing threat requiring vaccine development for disease prevention. *Pathog Glob Health*, 112, 294-305.
- BRAACK, L., GOUVEIA DE ALMEIDA, A. P., CORNEL, A. J., SWANEPOEL, R. & DE JAGER, C. 2018. Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasit Vectors*, 11, 29.
- BRIOLANT, S., GARIN, D., SCARAMOZZINO, N., JOUAN, A. & CRANCE, J. M. 2004. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. *Antiviral Res*, 61, 111-7.
- CARTER, K. H., SINGH, P., MUJICA, O. J., ESCALADA, R. P., ADE, M. P., CASTELLANOS, L. G. & ESPINAL, M. A. 2015. Malaria in the Americas: trends from 1959 to 2011. *Am J Trop Med Hyg*, 92, 302-316.
- CDC. 2020a. *About Dengue: What You Need to Know* [Online]. Centers for Disease Control and Prevention. Available: <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html> [Accessed 09.11.2020].
- CDC. 2020b. *About Malaria: Disease* [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> [Accessed 02.12.2020].
- CDC. 2020c. *About Malaria: Where Malaria Occurs* [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html> [Accessed 02.12.2020].
- CDC. 2020d. *Dengue around the world* [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/dengue/areaswithrisk/around-the-world.html> [Accessed 26.11.2020].
- CHAPARRO-NARVÁEZ, P., LEÓN-QUEVEDO, W. & CASTAÑEDA-ORJUELA, C. A. 2016. Dengue mortality in Colombia, 1985-2012. *Biomedica*, 36, 125-34.
- CHAPPUIS, F., ALIROL, E., D'ACREMONT, V., BOTTIEAU, E. & YANSOUNI, C. P. 2013. Rapid diagnostic tests for non-malarial febrile illness in the tropics. *Clin Microbiol Infect*, 19, 422-31.
- CHARREL, R. N., BRAULT, A. C., GALLIAN, P., LEMASSON, J. J., MURGUE, B., MURRI, S., PASTORINO, B., ZELLER, H., DE CHESSE, R., DE MICCO, P. & DE LAMBALLERIE, X. 2003. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains: Evidence for viral gene flow between africa, the middle east, and europe. *Virology*, 315, 381-388.
- CHEN, L. H. & WILSON, M. E. 2020. Yellow fever control: current epidemiology and vaccination strategies. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 6, 1.

- CHEVALIER, V., PÉPIN, M., PLÉE, L. & LANCELOT, R. 2010. Rift Valley fever--a threat for Europe? *Euro Surveill*, 15, 19506.
- CHIEN, L. J., LIAO, T. L., SHU, P. Y., HUANG, J. H., GUBLER, D. J. & CHANG, G. J. 2006. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol*, 44, 1295-304.
- CHIPPAUX, J. P. & CHIPPAUX, A. 2018. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 24, 20.
- CIA. 2020. *The World Factbook: Colombia* [Online]. CIA - Central Intelligence Agency of the United States of America. Available: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/co.html> [Accessed 29.12.2020].
- CODAZZI, I. I. G. A. 2002. *Atlas de Colombia*, Bogotá, Imprenta Nacional de Colombia: Bogotá.
- DANIEL, T. W. 2019a. *Etablierung einer Multiplex-PCR zur Diagnostik von arboviralen Infektionen und Malaria*. Dr. med. Doctor Thesis, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- DANIEL, T. W. 2019b. *Etablierung einer Multiplex-PCR zur Diagnostik von arboviralen Infektionen und Malaria*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- DELISLE, E., ROUSSEAU, C., BROCHE, B., LEPARC-GOFFART, I., L'AMBERT, G., COCHET, A., PRAT, C., FOULONGNE, V., FERRE, J. B., CATELINOIS, O., FLUSIN, O., TCHERNONOG, E., MOUSSION, I. E., WIEGANDT, A., SEPTFONS, A., MENDY, A., MOYANO, M. B., LAPORTE, L., MAUREL, J., JOURDAIN, F., REYNES, J., PATY, M. C. & GOLLIOT, F. 2015. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill*, 20.
- DHANOVA, A., HASSAN, S. S., NGIM, C. F., LAU, C. F., CHAN, T. S., ADNAN, N. A., ENG, W. W., GAN, H. M. & RAJASEKARAM, G. 2016. Impact of dengue virus (DENV) co-infection on clinical manifestations, disease severity and laboratory parameters. *BMC Infect Dis*, 16, 406.
- DIAGNE, C. T., BENGUE, M., CHOUMET, V., HAMEL, R., POMPON, J. & MISSÉ, D. 2020. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens*, 9.
- DICK, G. W., KITCHEN, S. F. & HADDOW, A. J. 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 46, 509-20.
- DONOSO MANTKE, O., MCCULLOCH, E., WALLACE, P. S., YUE, C., BAYLIS, S. A. & NIEDRIG, M. 2018. External Quality Assessment (EQA) for Molecular Diagnostics of Zika Virus: Experiences from an International EQA Programme, 2016-2018. *Viruses*, 10, 491.
- ECKERT, T. M. F. 2019. *Bedeutung respiratorischer Infektionen bei Malaria-ähnlichen Erkrankungen in Tansania*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Johannes-Gutenberg Universität Mainz.
- ESCADAFAL, C., FAYE, O., SALL, A. A., FAYE, O., WEIDMANN, M., STROHMEIER, O., VON STETTEN, F., DREXLER, J., EBERHARD, M., NIEDRIG, M. & PATEL, P. 2014. Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. *PLoS neglected tropical diseases*, 8, e2730-e2730.
- FERNANDES-MONTEIRO, A. G., TRINDADE, G. F., YAMAMURA, A. M., MOREIRA, O. C., DE PAULA, V. S., DUARTE, A. C., BRITTO, C. & LIMA, S. M. 2015. New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow

- fever virus on clinical samples with high quality parameters. *Hum Vaccin Immunother*, 11, 1865-71.
- FORSHEY, B. M., GUEVARA, C., LAGUNA-TORRES, V. A., CESPEDES, M., VARGAS, J., GIANELLA, A., VALLEJO, E., MADRID, C., AGUAYO, N., GOTUZZO, E., SUAREZ, V., MORALES, A. M., BEINGOLEA, L., REYES, N., PEREZ, J., NEGRETE, M., ROCHA, C., MORRISON, A. C., RUSSELL, K. L., BLAIR, P. J., OLSON, J. G. & KOCHER, T. J. 2010. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e787.
- GAIKWAD, S., SAWANT, S. S. & SHASTRI, J. S. 2017. Comparison of nonstructural protein-1 antigen detection by rapid and enzyme-linked immunosorbent assay test and its correlation with polymerase chain reaction for early diagnosis of dengue. *J Lab Physicians*, 9, 177-181.
- GIRARD, M., NELSON, C. B., PICOT, V. & GUBLER, D. J. 2020. Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine*, 38, 3989-3994.
- GOULD, E. A. & HIGGS, S. 2009. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103, 109-121.
- GRÖNDAHL, B., PUPPE, W., HOPPE, A., KÜHNE, I., WEIGL, J. A. & SCHMITT, H. J. 1999. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol*, 37, 1-7.
- GUTIERREZ-BARBOSA, H., MEDINA-MORENO, S., ZAPATA, J. C. & CHUA, J. V. 2020. Dengue Infections in Colombia: Epidemiological Trends of a Hyperendemic Country. *Trop Med Infect Dis*, 5.
- GUZMAN, M. G., ALVAREZ, M. & HALSTEAD, S. B. 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*, 158, 1445-59.
- HAAKE, D. A. & LEVETT, P. N. 2015. Leptospirosis in humans. *Current topics in microbiology and immunology*, 387, 65-97.
- HADDOW, A. J., DAVIES, C. W. & WALKER, A. J. 1960. O'nyong-nyong fever: An epidemic virus disease in East Africa 1. Introduction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 54, 517-522.
- HALSTEAD, S. B. 2003. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res*, 60, 421-67.
- HAYES, E. B., SEJVAR, J. J., ZAKI, S. R., LANCIOTTI, R. S., BODE, A. V. & CAMPBELL, G. L. 2005. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis*, 11, 1174-9.
- HORWOOD, P. F. & BUCHY, P. 2015. Chikungunya. *Rev Sci Tech*, 34, 479-89.
- HOTEZ, P. J. & MURRAY, K. O. 2017. Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika-and now Mayaro? *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005462.
- HUNSPERGER, E. A., YOKSAN, S., BUCHY, P., NGUYEN, V. C., SEKARAN, S. D., ENRIA, D. A., VAZQUEZ, S., CARTOZIAN, E., PELEGRINO, J. L., ARTSOB, H., GUZMAN, M. G., OLLIARO, P., ZWANG, J., GUILLERM, M., KLIKS, S., HALSTEAD, S., PEELING, R. W. & MARGOLIS, H. S. 2014. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3171.

- HUTH, P. F. B. E. A. 2021. Extensive Antibiotic and Antimalarial Prescription Rate among Children with Acute Febrile Diseases in the Lake Victoria Region, Tanzania. *Journal of Tropical Pediatrics*, 2021, 00, 1–10.
- INS 2019. Boletín Epidemiológico Semanal. In: SALUD, I. N. D. (ed.). Instituto Nacional de Salud, Colombia.
- INS 2020. Boletín Epidemiológico Semanal. In: SALUD, I. N. D. (ed.). Instituto Nacional de Salud, Colombia.
- IZMIRLY, A. M., ALTURKI, S. O., ALTURKI, S. O., CONNORS, J. & HADDAD, E. K. 2020. Challenges in Dengue Vaccines Development: Pre-existing Infections and Cross-Reactivity. *Front Immunol*, 11, 1055.
- JANG, W. S., KWAK, S. Y., MAY, W. L., YANG, D. J., NAM, J. & LIM, C. S. 2019. Comparative evaluation of three dengue duo rapid test kits to detect NS1, IgM, and IgG associated with acute dengue in children in Myanmar. *PLoS One*, 14, e0213451.
- JELINEK, T. 2009. Trends in the epidemiology of dengue fever and their relevance for importation to Europe. *Euro Surveill*, 14.
- JONES, S., SUTHERLAND, C. J., HERMSEN, C., ARENS, T., TEELLEN, K., HALLETT, R., CORRAN, P., VAN DER VEGTE-BOLMER, M., SAUERWEIN, R., DRAKELEY, C. J. & BOUSEMA, T. 2012. Filter paper collection of *Plasmodium falciparum* mRNA for detecting low-density gametocytes. *Malar J*, 11, 266.
- KAUFFMAN, E. B., JONES, S. A., DUPUIS, A. P., 2ND, NGO, K. A., BERNARD, K. A. & KRAMER, L. D. 2003. Virus detection protocols for west nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *J Clin Microbiol*, 41, 3661-7.
- KIKUTI, M., CUNHA, G. M., PAPLOSKI, I. A. D., KASPER, A. M., SILVA, M. M. O., TAVARES, A. S., CRUZ, J. S., QUEIROZ, T. L., RODRIGUES, M. S., SANTANA, P. M., LIMA, H. C. A. V., CALCAGNO, J., TAKAHASHI, D., GONÇALVES, A. H. O., ARAÚJO, J. M. G., GAUTHIER, K., DIUK-WASSER, M. A., KITRON, U., KO, A. I., REIS, M. G. & RIBEIRO, G. S. 2015. Spatial Distribution of Dengue in a Brazilian Urban Slum Setting: Role of Socioeconomic Gradient in Disease Risk. *PLoS neglected tropical diseases*, 9, e0003937-e0003937.
- KINDHAUSER, M. K., ALLEN, T., FRANK, V., SANTHANA, R. S. & DYE, C. 2016. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*, 94, 675-686c.
- KIWANUKA, N., SANDERS, E. J., RWAGUMA, E. B., KAWAMATA, J., SSENGOOBA, F. P., NAJEMBA, R., WERE, W. A., LAMUNU, M., BAGAMBISA, G., BURKOT, T. R., DUNSTER, L., LUTWAMA, J. J., MARTIN, D. A., CROPP, C. B., KARABATSOS, N., LANCIOTTI, R. S., TSAI, T. F. & CAMPBELL, G. L. 1999. O'Nyong-Nyong Fever in South-Central Uganda, 1996—1997: Clinical Features and Validation of a Clinical Case Definition for Surveillance Purposes. *Clinical Infectious Diseases*, 29, 1243-1250.
- KLÜBER, J. 2016. *Etablierung einer Multiplex-PCR zur Detektierung von Chikungunya, West Nil und Dengue*. Master of Science Master Thesis, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
- KOLIOPOULOS, P. 2019. *Design einer neun-valenten Multiplex-RT-PCR zur Erfassung moskito-übertragbarer Erreger in der Lake Victoria Region: Konservierung und Elution von Plasmodium sp. positiven Blutproben aus Filterkarten*. Dr. med., Johannes-Gutenberg-Universität

- KOLIOPOULOS, P., KAYANGE, N. M., DANIEL, T., HUTH, F., GRÖNDAHL, B., MEDINA-MONTAÑO, G. C., PRETSCH, L., KLÜBER, J., SCHMIDT, C., ZÜCHNER, A., ULBERT, S., MSHANA, S. E., ADDO, M. & GEHRING, S. 2021. Multiplex-RT-PCR-ELISA panel for detecting mosquito-borne pathogens: Plasmodium sp. preserved and eluted from dried blood spots on sample cards. *Malar J*, 20, 66.
- KRAEMER, M. U. G., REINER, R. C., JR., BRADY, O. J., MESSINA, J. P., GILBERT, M., PIGOTT, D. M., YI, D., JOHNSON, K., EARL, L., MARCZAK, L. B., SHIRUDE, S., DAVIS WEAVER, N., BISANZIO, D., PERKINS, T. A., LAI, S., LU, X., JONES, P., COELHO, G. E., CARVALHO, R. G., VAN BORTEL, W., MARSBOOM, C., HENDRICKX, G., SCHAFFNER, F., MOORE, C. G., NAX, H. H., BENGTSOON, L., WETTER, E., TATEM, A. J., BROWNSTEIN, J. S., SMITH, D. L., LAMBRECHTS, L., CAUCHEMEZ, S., LINARD, C., FARIA, N. R., PYBUS, O. G., SCOTT, T. W., LIU, Q., YU, H., WINT, G. R. W., HAY, S. I. & GOLDING, N. 2019. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol*, 4, 854-863.
- KRAMER, L. D., STYER, L. M. & EBEL, G. D. 2008. A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus. *Annual Review of Entomology*, 53, 61-81.
- KUTSUNA, S., SAITO, S. & OHMAGARI, N. 2020. Simultaneous diagnosis of dengue virus, Chikungunya virus, and Zika virus infection using a new point-of-care testing (POCT) system based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *J Infect Chemother*, 26, 1249-1253.
- LABEAUD, A. D., BANDA, T., BRICHARD, J., MUCHIRI, E. M., MUNGAI, P. L., MUTUKU, F. M., BORLAND, E., GILDENGORIN, G., PFEIL, S., TENG, C. Y., LONG, K., HEISE, M., POWERS, A. M., KITRON, U. & KING, C. H. 2015. High rates of o'nyong nyong and Chikungunya virus transmission in coastal Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003436.
- LEDNICKY, J., DE ROCHARS, V. M., ELBADRY, M., LOEB, J., TELISMA, T., CHAVANNES, S., ANILIS, G., CELLA, E., CICCOCCHI, M., OKECH, B., SALEMI, M. & MORRIS, J. G., JR. 2016. Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. *Emerg Infect Dis*, 22, 2000-2002.
- LINTHICUM, K. J., BRITCH, S. C. & ANYAMBA, A. 2016. Rift Valley Fever: An Emerging Mosquito-Borne Disease. *Annu Rev Entomol*, 61, 395-415.
- LIU, J., OCHIENG, C., WIERSMA, S., STROHER, U., TOWNER, J. S., WHITMER, S., NICHOL, S. T., MOORE, C. C., KERSH, G. J., KATO, C., SEXTON, C., PETERSEN, J., MASSUNG, R., HERCIK, C., CRUMP, J. A., KIBIKI, G., MARO, A., MUJAGA, B., GRATZ, J., JACOB, S. T., BANURA, P., SCHELD, W. M., JUMA, B., ONYANGO, C. O., MONTGOMERY, J. M., HOUP, E. & FIELDS, B. 2016. Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *J Clin Microbiol*, 54, 49-58.
- LOPEZ-JIMENA, B., WEHNER, S., HAROLD, G., BAKHEIT, M., FRISCHMANN, S., BEKAERT, M., FAYE, O., SALL, A. A. & WEIDMANN, M. 2018. Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. *PLoS neglected tropical diseases*, 12, e0006448-e0006448.
- LÓPEZ-MONTENEGRO, L. E., PULECIO-MONTOYA, A. M. & MARCILLO-HERNÁNDEZ, G. A. 2019. Dengue Cases in Colombia: Mathematical Forecasts for 2018-2022. *MEDICC Rev*, 21, 38-45.
- LUNDSTRÖM, J. 1999. Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 24, 1.

- MAGILL, A. J., RYAN, E. T., HILL, D. R. & SOLOMON, T. 2013. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease, 9th Edition*, London, Elsevier Inc.
- MANSFIELD, K. L., BANYARD, A. C., MCELHINNEY, L., JOHNSON, N., HORTON, D. L., HERNÁNDEZ-TRIANA, L. M. & FOOKS, A. R. 2015. Rift Valley fever virus: A review of diagnosis and vaccination, and implications for emergence in Europe. *Vaccine*, 33, 5520-5531.
- MARTÍNEZ-BELLO, D. A., LÓPEZ-QUÍLEZ, A. & PRIETO, A. T. 2019. Joint Estimation of Relative Risk for Dengue and Zika Infections, Colombia, 2015-2016. *Emerg Infect Dis*, 25, 1118-1126.
- MATHEUS, S., CHAPPERT, J. L., CASSADOU, S., BERGER, F., LABEAU, B., BREMAND, L., WINICKI, A., HUC-ANAIS, P., QUENEL, P. & DUSSART, P. 2012. Virological surveillance of dengue in Saint Martin and Saint Barthelemy, French West Indies, using blood samples on filter paper. *Am J Trop Med Hyg*, 86, 159-65.
- MATHEUS, S., MEYNARD, J.-B., LACOSTE, V., MORVAN, J. & DEPARIS, X. 2007. Use of Capillary Blood Samples as a New Approach for Diagnosis of Dengue Virus Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 887-890.
- MATHEUS, S., MEYNARD, J. B., LAVERGNE, A., GIROD, R., MOUA, D., LABEAU, B., DUSSART, P., LACOSTE, V. & DEPARIS, X. 2008. Dengue-3 outbreak in Paraguay: investigations using capillary blood samples on filter paper. *Am J Trop Med Hyg*, 79, 685-7.
- MATHIOT, C. C., GRIMAUD, G., GARRY, P., BOUQUETY, J. C., MADA, A., DAGUISY, A. M. & GEORGES, A. J. 1990. An outbreak of human Semliki Forest virus infections in Central African Republic. *Am J Trop Med Hyg*, 42, 386-93.
- MATHISON, B. A. & PRITT, B. S. 2017. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. *J Clin Microbiol*, 55, 2009-2017.
- MBOERA, L. E., MWEYA, C. N., RUMISHA, S. F., TUNGU, P. K., STANLEY, G., MAKANGE, M. R., MISINZO, G., DE NARDO, P., VAIRO, F. & ORIYO, N. M. 2016. The Risk of Dengue Virus Transmission in Dar es Salaam, Tanzania during an Epidemic Period of 2014. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004313.
- MEDINA-MONTAÑO, G. C. 2017. *Establishment of a m-RT-PCR for the diagnosis of arboviral etiologies of Malaria-like acute febrile illnesses*. Master of Science Master Thesis, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
- MEYER, C. G. 2019. *Tropenmedizin - Infektionskrankheiten, 3. Auflage*, Landsberg am Lech, ecomed-Storck GmbH.
- MOREIRA, J., BRESSAN, C. S., BRASIL, P. & SIQUEIRA, A. M. 2018. Epidemiology of acute febrile illness in Latin America. *Clin Microbiol Infect*, 24, 827-835.
- MOSTASHARI, F., BUNNING, M. L., KITSUTANI, P. T., SINGER, D. A., NASH, D., COOPER, M. J., KATZ, N., LILJEBJELKE, K. A., BIGGERSTAFF, B. J., FINE, A. D., LAYTON, M. C., MULLIN, S. M., JOHNSON, A. J., MARTIN, D. A., HAYES, E. B. & CAMPBELL, G. L. 2001. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet*, 358, 261-4.
- MULLER, D. A., DEPELSENAIRE, A. C. & YOUNG, P. R. 2017. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis*, 215, S89-S95.

- MUSIANI, M., VENTUROLI, S., GALLINELLA, G. & ZERBINI, M. 2007. Qualitative PCR-ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes. *Nat Protoc*, 2, 2502-10.
- MUSSO, D., ROCHE, C., ROBIN, E., NHAN, T., TEISSIER, A. & CAO-LORMEAU, V. M. 2015. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*, 21, 359-61.
- OKADA, K., MORITA, R., EGAWA, K., HIRAI, Y., KAIDA, A., SHIRANO, M., KUBO, H., GOTO, T. & YAMAMOTO, S. P. 2019. Dengue Virus Type 1 Infection in Traveler Returning from Tanzania to Japan, 2019. *Emerg Infect Dis*, 25, 1782-1784.
- PAIXÃO, E. S., TEIXEIRA, M. G. & RODRIGUES, L. C. 2018. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ global health*, 3, e000530-e000530.
- PANNING, M., GRYWNA, K., VAN ESBROECK, M., EMMERICH, P. & DROSTEN, C. 2008. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis*, 14, 416-22.
- PATEL, P., ABD EL WAHED, A., FAYE, O., PRÜGER, P., KAISER, M., THALOENGSO, S., UBOL, S., SAKUNTABHAI, A., LEPARC-GOFFART, I., HUFERT, F. T., SALL, A. A., WEIDMANN, M. & NIEDRIG, M. 2016. A Field-Deployable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of the Chikungunya Virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 10, e0004953-e0004953.
- PEPIN, M., BOULOY, M., BIRD, B. H., KEMP, A. & PAWESKA, J. 2010. Rift Valley fever virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res*, 41, 61.
- PERANDIN, F., MANCA, N., CALDERARO, A., PICCOLO, G., GALATI, L., RICCI, L., MEDICI, M. C., ARCANGELETTI, M. C., SNOUNOU, G., DETTORI, G. & CHEZZI, C. 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*, 42, 1214-9.
- PRADO, I., ROSARIO, D., BERNARDO, L., ÁLVAREZ, M., RODRÍGUEZ, R., VÁZQUEZ, S. & GUZMÁN, M. G. 2005. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *Journal of Virological Methods*, 125, 75-81.
- PUGLIA, A. L., REZENDE, A. G., JORGE, S. A., WAGNER, R., PEREIRA, C. A. & ASTRAY, R. M. 2013. Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. *J Virol Methods*, 193, 647-52.
- PUPO, M., GUZMÁN, M. G., FERNÁNDEZ, R., LLOP, A., DICKINSON, F. O., PÉREZ, D., CRUZ, R., GONZÁLEZ, T., ESTÉVEZ, G., GONZÁLEZ, H., SANTOS, P., KOURÍ, G., ANDONOVA, M., LINDSAY, R., ARTSOB, H. & DREBOT, M. 2006. West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. *Emerg Infect Dis*, 12, 1022-4.
- PUPPE, W., WEIGL, J., GRÖNDAHL, B., KNUF, M., ROCKAHR, S., VON BISMARCK, P., ARON, G., NIESTERS, H. G., OSTERHAUS, A. D. & SCHMITT, H. J. 2013. Validation of a multiplex reverse transcriptase PCR ELISA for the detection of 19 respiratory tract pathogens. *Infection*, 41, 77-91.
- RAMANAN, P., BRYSON, A. L., BINNICKER, M. J., PRITT, B. S. & PATEL, R. 2017. Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 31, e00024-17.

- RAMOS-CASTAÑEDA, J., BARRETO DOS SANTOS, F., MARTÍNEZ-VEGA, R., GALVÃO DE ARAUJO, J. M., JOINT, G. & SARTI, E. 2017. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005224.
- RECHT, J., SIQUEIRA, A. M., MONTEIRO, W. M., HERRERA, S. M., HERRERA, S. & LACERDA, M. V. G. 2017. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*, 16, 273.
- REITER, P. 2010. West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill*, 15, 19508.
- REZZA, G., CHEN, R. & WEAVER, S. C. 2017. O'nyong-nyong fever: a neglected mosquito-borne viral disease. *Pathog Glob Health*, 111, 271-275.
- RHEE, C., KHAROD, G. A., SCHAAD, N., FURUKAWA, N. W., VORA, N. M., BLANEY, D. D., CRUMP, J. A. & CLARKE, K. R. 2019. Global knowledge gaps in acute febrile illness etiologic investigations: A scoping review. *PLoS Negl Trop Dis*, 13, e0007792.
- RICCARDO, F., BOLICI, F., FAFANGEL, M., JOVANOVIĆ, V., SOCAN, M., KLEPAC, P., PLAVSA, D., VASIC, M., BELLA, A., DIANA, G., ROSI, L., PEZZOTTI, P., ANDRIANOU, X. D., DI LUCA, M., VENTURI, G., MARAGLINO, F., PERVANIDOU, D., CENCIARELLI, O., BAKA, A., YOUNG, J., BAKONYI, T., REZZA, G. & SUK, J. E. 2020. West Nile virus in Europe: after action reviews of preparedness and response to the 2018 transmission season in Italy, Slovenia, Serbia and Greece. *Globalization and health*, 16, 47-47.
- RIGAU-PÉREZ, J. G., CLARK, G. G., GUBLER, D. J., REITER, P., SANDERS, E. J. & VORNDAM, A. V. 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 352, 971-7.
- RIOS-GONZÁLEZ, C. M. 2017. Bibliometric study of international scientific production in O'nyong-Nyong virus during the years 1962-2016. *Journal of infection and public health*, 10, 137-138.
- ROBINSON, M. C. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 49, 28-32.
- RODRIGO, C., SIGERA, C., FERNANDO, D. & RAJAPAKSE, S. 2021. Plasma leakage in dengue: a systematic review of prospective observational studies. *BMC Infect Dis*, 21, 1082.
- RODRIGUES, N. C. P., DAUMAS, R. P., DE ALMEIDA, A. S., DOS SANTOS, R. S., KOSTER, I., RODRIGUES, P. P., GOMES, M. D. F., MACEDO, A. D. F., GERARDI, A. & LEITE, I. D. C. 2018. Risk factors for arbovirus infections in a low-income community of Rio de Janeiro, Brazil, 2015-2016. *PLoS one*, 13, e0198357-e0198357.
- SENARATNE, U. T. N., MURUGANANTHAN, K., SIRISENA, P., CARR, J. M. & NOORDEEN, F. 2020. Dengue virus co-infections with multiple serotypes do not result in a different clinical outcome compared to mono-infections. *Epidemiol Infect*, 148, e119.
- SHUKLA, M. K., SINGH, N., SHARMA, R. K. & BARDE, P. V. 2017. Utility of dengue NS1 antigen rapid diagnostic test for use in difficult to reach areas and its comparison with dengue NS1 ELISA and qRT-PCR. *J Med Virol*, 89, 1146-1150.
- SILVA, S. J. R. D., PARDEE, K. & PENA, L. 2019. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review. *Viruses*, 12, 19.
- SIMMONS, C. P., FARRAR, J. J., NGUYEN V, V. & WILLS, B. 2012. Dengue. *N Engl J Med*, 366, 1423-32.

- SMITHBURN, K. C., HUGHES, T. P., BURKE, A. W. & PAUL, J. H. 1940. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1-20, 471-492.
- TANSARLI, G. S. & CHAPIN, K. C. 2020. Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*, 26, 281-290.
- TEOH, B.-T., SAM, S.-S., TAN, K.-K., JOHARI, J., DANLAMI, M. B., HOOI, P.-S., MD-ESA, R. & ABUBAKAR, S. 2013. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infectious Diseases*, 13, 387.
- THIBERVILLE, S. D., MOYEN, N., DUPUIS-MAGUIRAGA, L., NOUGAIREDE, A., GOULD, E. A., ROQUES, P. & DE LAMBALLERIE, X. 2013. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*, 99, 345-70.
- THOMAS, S. J. & YOON, I. K. 2019. A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Hum Vaccin Immunother*, 15, 2295-2314.
- TIGOI, C., LWANDE, O., ORINDI, B., IRURA, Z., ONGUS, J. & SANG, R. 2015. Seroepidemiology of selected arboviruses in febrile patients visiting selected health facilities in the lake/river basin areas of Lake Baringo, Lake Naivasha, and Tana River, Kenya. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 15, 124-32.
- TOMASELLO, D. & SCHLAGENHAUF, P. 2013. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. *Travel Med Infect Dis*, 11, 274-84.
- VALENTINE, M. J., MURDOCK, C. C. & KELLY, P. J. 2019. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasit Vectors*, 12, 463.
- VERON, V., SIMON, S. & CARME, B. 2009. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Exp Parasitol*, 121, 346-51.
- VILLAR, L. A., ROJAS, D. P., BESADA-LOMBANA, S. & SARTI, E. 2015. Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003499.
- VU, D. M., JUNGKIND, D. & ANGELLE DESIREE, L. 2017. Chikungunya Virus. *Clin Lab Med*, 37, 371-382.
- WAGGONER, J. J., GRESH, L., MOHAMED-HADLEY, A., BALLESTEROS, G., DAVILA, M. J., TELLEZ, Y., SAHOO, M. K., BALMASEDA, A., HARRIS, E. & PINSKY, B. A. 2016a. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerg Infect Dis*, 22, 1295-7.
- WAGGONER, J. J., GRESH, L., VARGAS, M. J., BALLESTEROS, G., TELLEZ, Y., SODA, K. J., SAHOO, M. K., NUÑEZ, A., BALMASEDA, A., HARRIS, E. & PINSKY, B. A. 2016b. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63, 1584-1590.
- WANG, S. M. & SEKARAN, S. D. 2010. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. *Am J Trop Med Hyg*, 83, 690-5.

- WARD, T., SAMUEL, M., MAOZ, D., RUNGE-RANZINGER, S., BOYCE, R., TOLEDO, J., VELAYUDHAN, R. & HORSTICK, O. 2017. Dengue data and surveillance in Tanzania: a systematic literature review. *Trop Med Int Health*, 22, 960-970.
- WEAVER, S. C., CHARLIER, C., VASILAKIS, N. & LECUIT, M. 2018. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med*, 69, 395-408.
- WHO. 2009. *DENGUE GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL New Edition* [Online]. World Health Organization. Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871_eng.pdf?sequence=1 [Accessed 11.11.2020].
- WHO 2015. *Guidelines for the treatment of malaria*, World Health Organization.
- WHO. 2019. *Yellow Fever [Fact sheet]* [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever> [Accessed 03.12.2020].
- WHO. 2020a. *Dengue and severe dengue [Fact sheet]* [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> [Accessed 09.11.2020].
- WHO. 2020b. *Malaria [Fact sheet]* [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> [Accessed 02.12.2020].
- WILLEMS, W. R., KALUZA, G., BOSCHEK, C. B., BAUER, H., HAGER, H., SCHÜTZ, H. J. & FEISTNER, H. 1979. Semliki forest virus: cause of a fatal case of human encephalitis. *Science*, 203, 1127-9.
- WILLIAMS, M. C., WOODALL, J. P., CORBET, P. S. & GILLET, J. D. 1965. O'NYONG-NYONG FEVER: AN EPIDEMIC VIRUS DISEASE IN EAST AFRICA. 8. VIRUS ISOLATIONS FROM ANOPHELES MOSQUITOES. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 59, 300-6.
- YIP, W. C. L. 1980. Dengue Haemorrhagic Fever: Current Approaches to Management. *Medical Progress*
- YOUNG, P. R. 2018. Arboviruses: A Family on the Move. *Adv Exp Med Biol*, 1062, 1-10.
- ZAINABADI, K., ADAMS, M., HAN, Z. Y., LWIN, H. W., HAN, K. T., OUATTARA, A., THURA, S., PLOWE, C. V. & NYUNT, M. M. 2017. A novel method for extracting nucleic acids from dried blood spots for ultrasensitive detection of low-density Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections. *Malar J*, 16, 377.
- ZIEGLER, U., SANTOS, P. D., GROSCHUP, M. H., HATTENDORF, C., EIDEN, M., HÖPER, D., EISERMANN, P., KELLER, M., MICHEL, F., KLOPFLEISCH, R., MÜLLER, K., WERNER, D., KAMPEN, H., BEER, M., FRANK, C., LACHMANN, R., TEWS, B. A., WYLEZICH, C., RINDER, M., LACHMANN, L., GRÜNEWALD, T., SZENTIKS, C. A., SIEG, M., SCHMIDT-CHANASIT, J., CADAR, D. & LÜHKEN, R. 2020. West Nile Virus Epidemic in Germany Triggered by Epizootic Emergence, 2019. *Viruses*, 12.
- ZULUAGA-IDÁRRAGA, L., BLAIR, S., AKINYI OKOTH, S., UDHAYAKUMAR, V., MARCET, P. L., ESCALANTE, A. A., ALEXANDER, N. & ROJAS, C. 2016. Prospective Study of Plasmodium vivax Malaria Recurrence after Radical Treatment with a Chloroquine-Primaquine Standard Regimen in Turbo, Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*, 60, 4610-9.

8 Anhang

Protokoll der Ethikkommission der Universität von Antioquia



**COMITÉ DE BIOÉTICA
SEDE INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA
CBE-SIU**

ACTA DE APROBACION: 19-32-878

Nombre completo del proyecto: "DETERMINACIÓN DE LA ETIOLOGÍA VIRAL EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL AGUDO DE QUIBDÓ, TURBO Y APARTADO, COLOMBIA".

Sometido por: [REDACTED]

Fecha en que fue aprobado por el comité: 06 de noviembre de 2019

La SEDE DE INVESTIGACION UNIVERSITARIA constituyó mediante la Resolución 001 de Mayo 2 de 2005 de la Dirección Científica de la SIU el Comité de Bioética de investigación en Humanos CBE-SIU, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última actualización del año 2013; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991) y la Resolución 2378 de 2008 del Ministerio de la Protección Social de Colombia que adopta las Buenas Prácticas Clínicas para las instituciones que conducen investigación con medicamentos en seres humanos (cuando aplique).

El CBE SIU certifica que:

1. Se revisaron y aprobaron los siguientes documentos del proyecto:

- a. (X) Protocolo de investigación (Explicación y ampliación si el estudio está enmarcado dentro de un macroproyecto).
- b. (X) Formato(s) de consentimiento y/o asentimiento informado
- c. (X) Hojas de vida de los investigadores
- d. () Formato de recolección de datos
- e. () Folleto del investigador
- f. () Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)
- g. () Informe de actividades-renovación de aval

1. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros: (El Comité de Bioética cuenta con diez (10) integrantes, para que haya quórum es necesario la presencia de al menos seis (6) de ellos, en la reunión del 06 de noviembre participaron):

[REDACTED]

Comité de Bioética de Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria CBE-SIU
Edificio SIU - Calle 62-52-59 Telefax: (574) 2196402
Medellín - Colombia

Página 1 de 4

- 2. El Comité consideró que el presente estudio:** Es válido desde el punto vista ético. La investigación representa un riesgo mínimo para los sujetos que participan.
3. Conforme con la Resolución 8430 de 1993, el Comité tendrá acceso permanente a los datos del estudio, sin que esto vulnere la confidencialidad de la información de los participantes.
 4. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
 5. El Comité considera adecuada la forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio.
 6. El Comité informará inmediatamente a los entes reguladores, correspondientes según el caso
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
 7. El Comité informará inmediatamente a las directivas de la SIU, toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación
 - b. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
 - c. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.
 8. El presente proyecto queda aprobado por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.
Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente a este comité, con todos los documentos que permitan su revisión actualizada: estos incluyen, informe de actividades relacionadas con la captación y seguimiento de los participantes, fecha de iniciación, modificaciones solicitadas y previamente aprobadas por este Comité. El informe debe constar con toda la información relativa a los participantes y al mecanismo de toma de consentimiento informado.
 9. El Investigador principal deberá:
 - a. Informar cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del CBE-SIU excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
 - b. Avisar cualquier situación imprevista que se considere implica riesgos para los sujetos, la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
 - c. Informar cualquier evento adverso serio de algún participante, comunicando la situación a la secretaría y a la presidencia del CBE-SIU, dentro de las primeras 24

Comité de Bioética de Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria CBE-SIU
Edificio SIU : Calle 62 52-59. Telefax (574) 2196402
Medellín - Colombia



horas de ocurrido el incidente, tal como lo dispone la resolución 2378 de 2008 y la resolución 2011020764 de 2011, ambas del Ministerio de la Protección Social.

d. Poner en conocimiento del Comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.

e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.

f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones y las implicaciones que esto tiene para el cumplimiento de los objetivos del proyecto.

10. Observaciones

- En la guía de presentación del proyecto hace falta identificar a las poblaciones Afrocolombianas e indígenas como sujetos partícipes de la investigación, ya que la zona en la que se desarrollará la captación de participantes tiene predominancia la población afrocolombiana e indígena.
- Aclarar en el CI sobre la movilización de las muestras sanguíneas, ya que en el protocolo se especifica que serán enviadas a Alemania para su estudio y diagnóstico. (Ver el apartado de procedimientos, página 18 Protocolo).
- En el consentimiento informado y asentimiento se debe informar en el apartado de uso de muestras futuras que el material biológico será estudiado en la universidad de Alemania y su utilización se restringirá para la presente investigación.
- El comité sugiere responder las siguientes preguntas:
 - ¿Cuál es la razón por la que se deben enviar las muestras sanguíneas a la universidad de Alemania?
 - ¿Cuál es la razón que sustenta el procedimiento de la segmentación de ADN?
- Informar y sustentar cuánto tiempo dispondrá la Universidad extranjera el material biológico.
- Aclarar en el CI cuando se refiere a la realización de exámenes médicos de forma gratuita, ¿a qué exámenes específicamente se están refiriendo? y si estos están cubiertos por el sistema de salud de la persona o si serán subsidiados por el proyecto de investigación.
- Anexar el formato de encuesta a la que se refiere en el CI.

Nombre: [REDACTED]
Titulo: [REDACTED]
Cargo CBE-SIU: Presidenta




Asistente CBE-SIU

Sede de Investigación Universitaria
Universidad de Antioquia
CBE - SIU
2013 nov 06
Firma

Einverständniserklärung Erwachsene

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: **Determinación de la etiología viral en pacientes con Síndrome Febril Agudo de Quibdó, Turbo y Apartadó, Colombia 2019-2020.**

Investigadores Responsables:

Grupos de Investigación participantes:

Grupo Malaria. Sede de Investigación Universitaria. Universidad de Antioquia. Calle 62 No. 52-59. Tel/Fax: 219 6487 e-mail: malaria@arhuaco.udea.edu.co. Centro Médico de la Universidad de Mainz.

Sitios del estudio: Quibdó, Turbo, y Apartadó

Entidades que patrocinan la investigación: Universidad de Antioquia y Universidad de Johannes Gutenberg de Mainz

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE:

Los casos de enfermedad con fiebre representan un problema de salud pública por su alto número en la comunidad, porque es difícil identificar la causa y porque pueden llevar a enfermedad grave y a la muerte. En la región de Urabá y en Quibdó una de las causas más frecuentes de fiebre son malaria y dengue, sin embargo, existen otras causas poco reconocidas debido a que no se sospechan o que no se tienen los recursos para el diagnóstico en cada municipio.

En la región donde vives una de las causas más frecuentes de fiebre es la malaria, sin embargo muchos de los pacientes que acuden a los servicios de salud tienen un resultado negativo para malaria, de manera que es necesario buscar otros agentes infecciosos. Dado que se dispone de pocos métodos para diagnóstico en tu municipio, no se conoce bien la presencia de distintos virus que producen enfermedad y que se manifiestan con fiebre. Estamos haciendo un estudio para identificar si los pacientes con fiebre que tienen examen negativo para malaria, tienen distintos virus como el virus del zika, chikungunya, fiebre amarilla y otros de importancia para la salud pública.

El estudio se realizará con 200 pacientes de 3 municipios colombianos durante 4 meses, quienes acuden a los hospitales locales por enfermedad de inicio reciente. Como Usted (o su hijo) presentan fiebre y otros síntomas, si está de acuerdo puede hacer parte de este estudio. Antes de otorgar su consentimiento para participar, es importante que usted lea y comprenda la siguiente explicación sobre el estudio y los procedimientos.

Su participación (o la de su hijo) es estrictamente voluntaria, su autonomía será respetada y tiene derecho a retirarse del estudio en cualquier momento y terminar la participación sin recibir ninguna sanción y sin que ello afecte la atención médica que debe recibir.

Si usted (o su hijo) está de acuerdo en participar, además de realizarse la historia clínica de rutina en el hospital donde se registrarán sus datos de identificación, se le hará una encuesta para conocer datos sociales, de su entorno familiar y ambiental; se le hará una revisión por un médico del equipo investigador; su participación será solo el día de la consulta. El proceso de atención en la institución donde consultó no se verá afectado y usted recibirá la atención y tratamiento según los criterios del médico tratante.

Participación Voluntaria: Su participación en este estudio es libre y voluntaria, si usted está de acuerdo en participar (o que su hijo participe) deberá firmar este consentimiento. La información y las muestras obtenidas no serán usadas en ningún momento para fines comerciales. Usted puede retirarse del estudio en el momento que desee sin que se vea afectada su atención en el servicio de salud y sin que haya ningún tipo de sanción por parte de los investigadores ni el personal de salud.

Procedimientos del estudio: Se hará una evaluación médica completa y a todos los pacientes se tomará una muestra por punción capilar para el diagnóstico de malaria y de dengue, y medir nivel de hemoglobina; estos resultados los entregaremos al médico tratante para orientar el diagnóstico y tratamiento. Además, de una vena del brazo se tomarán 4 centímetros cúbicos de sangre para diagnóstico de agentes infecciosos: Malaria, Dengue, Fiebre amarilla, Zika, Chikungunya, Virus del oeste del Nilo, Virus Onyong-nyong, Virus del Bosque Semliki y Virus de Fiebre del valle Rift.

Uso futuro muestras: Las muestras de sangre serán almacenadas para realizar los exámenes en un laboratorio especializado; estos resultados solo se conocerán meses después y serán entregados a la Secretaría de salud con fin de mejorar las ayudas diagnósticas en su municipio. La muestra sobrante será descartada después de realizar los procedimientos.

Riesgos: Los procedimientos aquí descritos se consideran de riesgo mínimo y se ajustan a las resoluciones 008430 y 2378 del Ministerio de la Protección Social de Colombia de 1993 y a las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos de 2002 (CIOMS) y la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 2008. Los riesgos se relacionan con la toma de muestra de sangre y consisten en dolor leve en el sitio de punción de la vena y enrojecimiento; se podría producir una infección local o incluso una infección generalizada. Las personas que le tomarán las muestras de sangre han sido entrenadas para evitar en lo posible que esto ocurra, usarán materiales nuevos y agujas desechables y estériles.

Beneficios para el participante: Usted (o su hijo) se beneficiarán directamente al recibir diagnóstico oportuno de malaria o dengue; además identificaremos si tiene anemia; ello servirá para que el médico del hospital oriente el tratamiento y solicite exámenes complementarios si lo considera necesario. De otro lado esperamos que los resultados obtenidos contribuyan a conocer si en su comunidad se presentan enfermedades infecciosas virales que no se buscan de rutina, beneficiando a la comunidad en general.

Alternativas del estudio: En este estudio usaremos técnicas de laboratorio especializadas para detección de agentes infecciosos que no están disponibles en los hospitales de primer nivel. Este diagnóstico se hará en centros diagnósticos especializados de Alemania y Medellín.

Compensaciones y gastos: Usted no recibirá incentivos para participar; no incurrirá en ningún tipo de gasto debido al examen médico o a los exámenes de laboratorio relacionados con este estudio. Tampoco será compensado económicamente por participar.

Confidencialidad: Para proteger la confidencialidad de la información que usted nos suministrará, los formatos serán codificados y estos códigos serán conocidos solo por los investigadores que participen del estudio. Para asegurarse de esto, los formatos serán guardados en las instalaciones del Grupo Malaria, en Medellín, en un archivo que será destinado para tal fin y al que tendrá acceso exclusivo solo el personal del estudio.

Obligaciones del participante: Al firmar este consentimiento usted (o su hijo) aceptan la toma de las muestras correspondientes. Debe aceptar contestar las preguntas que se le realicen, sin embargo, puede negarse a contestar aquellas que usted considere.

Compromiso de los investigadores: Los investigadores nos comprometemos a: 1) Guardar en secreto su información personal 2) Responderle clara y oportunamente todas las preguntas relacionadas con la investigación, 3) Asegurar que reciba la atención con el personal médico del hospital, 4) Entregarle los resultados de sus exámenes.

Este consentimiento no libera a los investigadores, ni a las instituciones participantes de la obligación de responder por cualquier acto o conducta mal realizada con la información o muestras entregadas. Usted puede retirarse del estudio en cualquier momento sin recibir ningún tipo de sanción. Los investigadores no tenemos ninguna obligación de hacer o financiar estudios adicionales sobre su salud o enfermedad o la de su familia.

Divulgación: Los resultados de este estudio sólo serán conocidos por los investigadores y su identidad no aparecerá en ninguna publicación o informe. Los resultados serán divulgados en cada comunidad a la Secretaría de salud y se publicarán en una revista científica.

Resultados esperados: Los resultados de esta investigación contribuirán a conocer las principales causas de enfermedad febril de origen infeccioso en su municipio y proponer métodos de diagnóstico. La información derivada de este estudio será muy importante para contribuir a mejorar las estrategias de control y tratamiento en el país.

Si necesita aclarar alguna pregunta, usted podrá contactarse con las personas encargadas de este estudio en Medellín: el Coordinador del Grupo Malaria, Doctor Alberto Tobón Castaño (tel 2196486). Este proyecto tiene aval del Comité de Ética de la Sede de Investigaciones de la Universidad de Antioquia (Acta 2019). Cualquier duda podrá ser atendida por su director Jazmín Cacante en los teléfonos 2196612, 2196402 en Medellín.

Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas y/o mímicas para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, consciente y libremente.

Firmando este documento, usted manifiesta que acepta libremente participar y que comprende todos los aspectos de esta investigación.

Firma del participante (huella si no sabe firmar)
CC:
Dirección:

Firma del representante legal (si aplica)
CC:
Dirección:

Firma del testigo 1
CC:
Dirección:

Firma del testigo 2
CC:
Dirección:

Firma del investigador
CC:
Teléfono:

Fecha (día/mes/año)

Einverständniserklärung Minderjährige

FORMULARIO DE ASENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: **Determinación de la etiología viral en pacientes con Síndrome Febril Agudo de Quibdó, Turbo y Apartadó, Colombia 2019-2020.**

Investigadores Responsables:



Grupos de Investigación participantes:

Grupo Malaria. Sede de Investigación Universitaria. Universidad de Antioquia. Calle 62 No. 52-59. Tel/Fax: 210 6487 e-mail: malaria@arhuaco.udea.edu.co. Centro Médico de la Universidad de Mainz.

Sitios del estudio: Quibdó, Turbo, y Apartadó

Entidades que patrocinan la investigación: Universidad de Antioquia y Universidad de Johannes Gutenberg de Mainz

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE:

Los casos de enfermedad con fiebre representan un problema de salud pública por su alto número en la comunidad, porque es difícil identificar la causa y porque pueden llevar a enfermedad grave y a la muerte. En la región donde vives una de las causas más frecuentes de fiebre es la malaria, sin embargo muchos de los pacientes que acuden a los servicios de salud tienen un resultado negativo para malaria, de manera que es necesario buscar otros agentes infecciosos. Dado que se dispone de pocos métodos para diagnóstico en tu municipio, no se conoce bien la presencia de distintos virus que producen enfermedad y que se manifiestan con fiebre. Estamos haciendo un estudio para identificar si los pacientes con fiebre que tienen examen negativo para malaria, tienen distintos virus como el virus del zika, chikungunya, fiebre amarilla y otros de importancia para la salud pública.

Te daré la información para invitarte a participar de esta investigación y te entregaré una copia de este documento para que lo revises con tus padres. Yo voy a leerlo contigo ahora, puede que haya algunas palabras que no entiendas o cosas que quieras que te las explique mejor, puedes pedirme que pare en cualquier momento y tomaré tiempo para explicártelo.

Participación Voluntaria: Puedes elegir participar o no. Hemos discutido esta investigación con tus padres (ó apoderado) y ellos saben que te estamos preguntando a ti también para tu aceptación. Si vas a participar en la investigación, tus padres (ó apoderado) también tienen que aceptarlo. Pero si no deseas tomar parte en la investigación no tienes por qué hacerlo, aun cuando tus padres lo hayan aceptado. Es tu decisión si decides participar, si no quieres participar solo dímelo y nada cambiará. Si dices que "sí" ahora, puedes cambiar de idea más tarde y estará bien.

Entiendo que mi participación es voluntaria _____ (poner una X)

Procedimientos del estudio:

Un médico te va a revisar para entender por qué estás enfermo y vamos a tomarte una muestra de sangre de tu dedo y de tu brazo para saber si tienes malaria u otra enfermedad causada por virus. Además, revisaremos si tienes anemia. En caso de que tengas malaria un médico del hospital se encargará de darte un tratamiento para esta enfermedad

Entiendo los procedimientos que se realizarán _____ (poner una X)

Riesgos

Es posible que durante la toma de la muestra de sangre experimentes un poco de dolor o miedo cuando te estemos sacando la sangre de la vena y del dedo. Las cantidades de sangre que se toman son muy pequeñas y no afectarán tu salud, generalmente solo se produce un poco de enrojecimiento y endurecimiento en el sitio donde se toma la muestra. Esto debería de desaparecer en un día. Si duele por más tiempo o si se endurece por más

tiempo o se hincha, comunícaselo a tus padres o a mí. Si te sientes mal mientras te tomo la muestra, dímelo.

Entiendo los riesgos _____ (poner una X)

Beneficios para el participante: Si decides participar en el estudio el diagnóstico de malaria o dengue serán gratuitos; además identificaremos si tienes anemia; ello servirá para que el médico del hospital oriente el tratamiento y solicite exámenes complementarios si lo considera necesario.

Entiendo los beneficios _____ (poner una X)

Incentivos

Si participas no habrá ningún pago o regalo por hacerlo.

Confidencialidad

Toda la información que conozcamos acerca de ti y tu estado de salud solo la sabremos nosotros y no se la daremos a nadie diferente a tus padres o al médico para que te atienda.

Divulgación

Al finalizar tu participación te informaremos los resultados de las pruebas que te hagamos y cuando finalicemos la investigación los resultados serán discutidos con otros investigadores.

Puedes hacerme preguntas ahora o más tarde. Tengo un número y dirección donde tus padres me pueden localizar para cualquier duda sobre el estudio.

Firma del Participante

Sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo. Sé que puedo retirarme cuando quiera. Me han leído la información y la entiendo. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo. Entiendo que cualquier cambio se discutirá conmigo. Acepto participar en la investigación.

Firma del niño o niña (huella si no sabe firmar)
Dirección:

Firma del acudiente
CC:

Dirección:

Firma del testigo 1
CC:

Firma del testigo 2
CC:

Dirección:

Dirección:

Firma del investigador
CC:
Teléfono:

Fecha (día/mes/año)